

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA
IN SCIENZE CHIMICHE**

Ciclo XX

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: CHIM/03

**SENSORI CHIMICI BASATI SU MOLECOLE E
NANOPARTICELLE**

Presentata da: Gionata Battistini

Coordinatore Dottorato

**Ch.mo Prof.
Vincenzo Balzani**

Relatore

Ch.mo Prof. Luca Prodi

Esame finale anno 2008

INDICE

Pagina

CAPITOLO 1 - Nanotecnologie e sensori chimici

1.1	Introduzione	4
1.2	Importanza dello sviluppo di una metodica per rilevare analiti di interesse.	5
1.3	Cenni di fotochimica di base	6
1.4	La chimica dei sensori	10
1.5	Chimica supramolecolare e progettazione di chemosensori	11
1.6	Schema di un chemosensore	14
1.7	Processi legati al funzionamento dei sensori	17
1.7.1	PeT, "Photoinduced Electron Transfer"	17
1.7.2	PET, "Photoinduced Energy Transfer"	19
1.8	Uso di supporti solidi	20
1.9	Naso e lingua elettronici	20
1.10	Le nanotecnologie: le nanoparticelle	22
1.11	Scopo della tesi	24
1.12	Bibliografia	25

CAPITOLO 2 - Strumentazione e metodi

2.1	Spettri di assorbimento elettronico	30
2.2	Spettri di emissione ed eccitazione	31
2.3	Misure di tempi di vita di stati eccitati emittenti	33
2.4	Misure dei rendimenti quantici di emissione	34
2.5	Deposizione di film su vetro	35
2.6	Bibliografia	37

Pagina**CAPITOLO 3 - Sensori fluorescenti per analiti gassosi**

3.1	Cavitandi fluorescenti: l'idea	38
3.2	Misure in soluzione	41
3.3	Il sensore.....	45
3.4	Setup strumentale.....	47
3.5	Misure all'interfaccia solido-gas	48
3.6	Prospettive future	54
3.7	Bibliografia	55

CAPITOLO 4 - Nanoparticelle di oro

4.1	Introduzione	56
4.2	Sintesi delle nanoparticelle di oro.....	59
4.3	Interazione fra cromoforo e nanoparticella.....	61
4.4	Il pirene e le nanoparticelle di oro	63
4.5	Influenza della distanza e del legante su sistemi di nanoparticelle di oro derivatizzate con unità pireniche	64
4.6	Nanoparticelle di oro emittenti: luminescenza NIR sensibilizzata da unità pireniche.	73
4.7	Esteri propargilici e Metallotropic Shift su superfici di oro: una strategia per la sintesi di nanoparticelle stabilizzate con alchini fluorescenti	79
4.8	Bibliografia	84

Pagina**CAPITOLO 5 - Una nuova sonda fluorescente per
superfici di silicio nanofunzionalizzate**

5.1	Introduzione	97
5.2	Self-Assembly di nanogabbie di coordinazione su superfici Si(100)	99
5.3	La nuova sonda fluorescente: l'idea e la progettazione	103
5.4	Risultati ottenuti e discussione	105
5.5	Bibliografia	110

CAPITOLO 6 - Conclusioni e pubblicazioni	112
---	------------

CAPITOLO 1

SENSORI CHIMICI E NANOTECNOLOGIE

1.1 Introduzione.

"L'universo - scrive Galileo Galilei ne Il Saggiatore - é un libro scritto in lingua matematica, e i caratteri sono triangoli, cerchi e altre figure geometriche".

Alle origini della scienza moderna c'è l'idea che la natura sia un libro, in cui sono scritte le leggi che ne regolano l'ordine ed il funzionamento. Se la natura é un libro, l'essere umano é il lettore, cui tocca voltare le pagine, e comprendere per intero la trama. Leggere il libro della natura ha anche portato con sé il desiderio di scriverne e riprodurne alcuni passi. Così alla scienza, che cerca le leggi della natura, si é affiancata la tecnica. E oggi l'opera dell'uomo si é spinta fin nelle pieghe dell'atomo e del codice genetico.

La ricerca sempre più approfondita nel "*libro natura*" ha permesso un passaggio fondamentale, lo scienziato ed in particolar modo il chimico è passato dalla figura di osservatore a quella di inventore, con concomitanti grandi progressi di scienza e tecnologia, che hanno portato ad un notevole miglioramento della qualità della vita per l'uomo. Parallelamente alle nuove tecnologie sono però sorte anche molte nuove problematiche, non irrilevanti, come ad esempio l'aumento di patologie anche gravi come conseguenza dell'inquinamento ambientale. Non si può non menzionare il caso del Petrolchimico di Porto Marghera, in cui morirono 160 operai e molti altri rimasero menomati a causa delle lavorazioni diretta di CVM (cloruro di vinile monomero) e PVC (polivinilcloruro)¹. Molti purtroppo sono gli esempi che si possono fare, dal campo alimentare (utilizzo o esposizione ad agenti inquinanti durante il ciclo di produzione), agricolo (utilizzo di insetticidi), ambientale (polveri

sottili, amianto) e in campo bellico (uranio impoverito e le più svariate sostanze altamente tossiche)²⁻⁴.

Si può dire che la nostra società vive la contraddizione tra i vantaggi che lo sviluppo le assicura e il degrado dell'ambiente derivante dallo sfruttamento delle risorse, che non possono, attualmente, essere rinnovate con la stessa velocità con la quale sono utilizzate.

Risulta quindi fondamentale l'adozione di tecnologie sempre più evolute che possono, da un lato, facilitare azioni di monitoraggio continuo che consentano di gestire le situazioni di emergenza e di attività ordinaria o, dall'altro, predisporre servizi innovativi che, pur preservando le caratteristiche ambientali, consentano un miglioramento nella qualità della vita quotidiana. Tra le varie aree di sviluppo tecnologico si può sicuramente inserire quella rivolta allo sviluppo di “sensori”.

1.2. Importanza dello sviluppo di una metodica per rilevare analiti di interesse.

Al giorno d'oggi il termine “sensore” è diventato di uso comune: non è infatti indispensabile avere una formazione specifica per poter intendere, quantomeno in maniera generale, il significato e l'importanza di sistemi contenenti sensori.

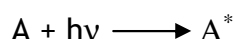
Attualmente infatti tali dispositivi sono presenti dappertutto con l'intento di migliorare la qualità della nostra vita in ogni applicazione tecnologicamente avanzata. Sono ad esempio un elemento essenziale per il controllo e la diagnostica in settori come la casa, l'auto, la medicina, l'automazione industriale, le telecomunicazioni, l'ambiente, l'agricoltura. I sensori trovano ormai ampia applicazione nei più svariati campi, quali il monitoraggio ambientale, analisi alimentare, nella diagnosi medica e, più recentemente, nella rilevazione di gas tossici e di materiali esplosivi.

Tra i differenti analiti di interesse per i quali vengono progettati i sensori, una speciale attenzione è sicuramente rivolta alla possibilità di determinare ioni metallici. La determinazione di cationi è, infatti, di grande importanza per svariate

applicazioni. Ad esempio, sodio, potassio, magnesio, e calcio sono coinvolti in molti processi biologici come la trasmissione di impulsi nervosi, contrazione muscolare e regolazione dell'attività cellulare. In medicina è importante poter controllare i livelli di Litio nei pazienti sottoposti a cure antidepressive o i livelli di Potassio nel sangue di chi soffre di pressione alta solo per citare due esempi. Anche i metalli di transizione sono di grande interesse in quanto generalmente tossici ma largamente utilizzati in processi industriali, il cui rilascio nell'ambiente deve dunque essere controllato scrupolosamente in quanto possono rappresentare un serio pericolo per la salute dei sistemi viventi. I metalli pesanti infatti penetrano in maniera insidiosa nel nostro organismo attraverso cibi, bevande e aria. Interferiscono con parecchi processi vitali bloccando l'attività di numerosi complessi enzimatici, tanto che attualmente si ritiene che la presenza di tali metalli giochi un ruolo fondamentale su un elevato numero di patologie del metabolismo. Metalli come l'alluminio, piombo e mercurio vengono definiti xenobiotici ed esercitano effetti tossici sull'organismo, anche se di diversa entità, a qualsiasi livello di esposizione. Alcuni metalli come ferro, rame e selenio in bassissime concentrazioni sono necessari allo svolgersi delle normali funzioni metaboliche, ma risultano essere tossici a dosaggi superiori. Anche da queste brevi considerazioni si comprende bene l'importanza dello sviluppo di metodiche per il monitoraggio qualitativo e quantitativo di tali sostanze sia in matrice biologica che ambientale.

1.3. Cenni di fotochimica di base

Prima di entrare nello specifico del lavoro di questa tesi, risulta utile riportare alcuni brevi richiami dei principi della fluorescenza e di alcune proprietà chimico fisiche ad essa legate, utili nella descrizione dei sistemi studiati in questo lavoro. Alla base del fenomeno dell'emissione, c'è generalmente l'assorbimento di un fotone ($h\nu$) di energia opportuna da parte di una molecola che si trova nel suo stato elettronico fondamentale e che successivamente all'assorbimento si viene a trovare in uno dei suoi stati eccitati:



Lo stato eccitato comporta generalmente una distribuzione elettronica differente da quella dello stato fondamentale, e questo conferisce alla molecola nuove proprietà chimico fisiche (diversa geometria, differenti proprietà redox, proprietà magnetiche, etc.). La specie eccitata A^* che si genera, va dunque considerata come una nuova specie chimica con caratteristiche chimico fisiche proprie.

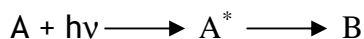
Gli stati elettronici eccitati sono specie a vita molto breve (vedi Schema1) con la tendenza, più o meno marcata, a riportarsi allo stato elettronico fondamentale cedendo l'eccesso di energia tramite differenti processi di disattivazione; a seconda del tipo di molecola, del tipo di stato eccitato e delle condizioni sperimentali, potrà prevalere l'uno o l'altro di questi processi, che possiamo raggruppare in due differenti categorie:

PROCESSO DI DECADIMENTO RADIATIVO, processo che genera luminescenza: l'energia in eccesso viene rilasciata liberando un fotone di energia $h\nu'$ (con $h\nu' < h\nu$);

PROCESSO DI DECADIMENTO NON RADIATIVO, in questo caso l'energia può essere rilasciata sotto forma di energia vibrazionale generando calore;

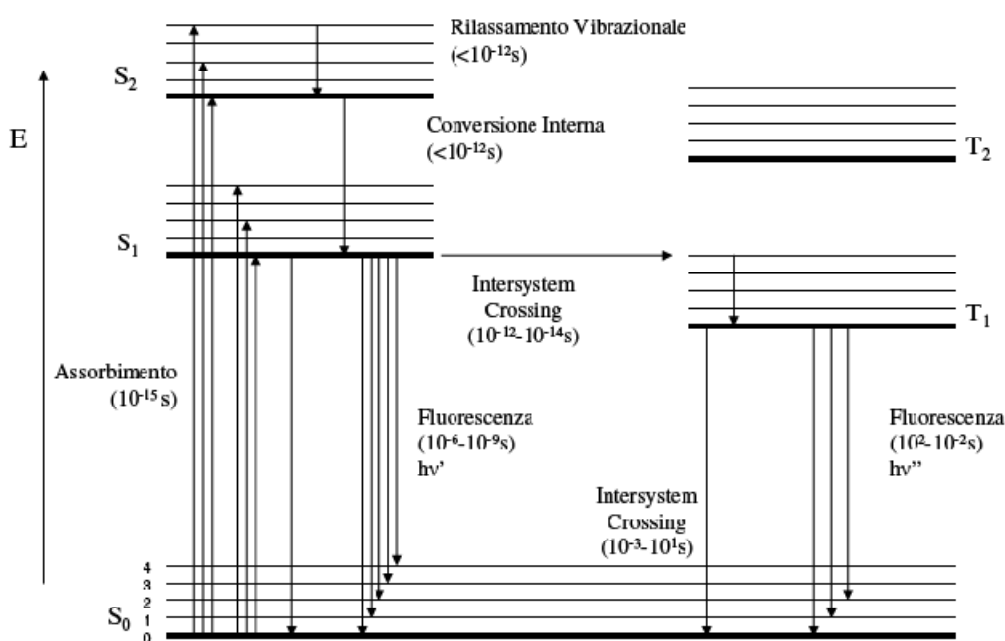


oppure si possono avere trasformazioni chimiche della specie eccitata in una nuova e diversa specie:



Diagrammi di Jablonski

Per meglio comprendere cosa accade ad una molecola dopo che ha assorbito un fotone si schematizzano i vari stati elettronici in funzione dell'energia in quello che viene chiamato diagramma di Jablonski, che riassume in modo dettagliato le varie possibilità di eccitazione e disattivazione del sistema.



Schema 1. Diagramma di Jablonsky per una generica molecola organica

Nell'esempio di schema 1, con la linea più grossa sono rappresentati gli stati elettronici eccitati; lo stato fondamentale S₀, i primi due singoletti S₁ e S₂, e i primi due tripletti T₁ e T₂. Le linee sottili invece rappresentano gli stati vibrazionalmente eccitati che competono ai vari livelli elettronici.

In base alle regole di selezione per l'assorbimento, l'eccitazione con un fotone di energia luminosa fa sì che la molecola si porti ad uno dei livelli vibrazionalmente eccitati corrispondenti ad un livello elettronico normalmente della stessa molteplicità dello stato fondamentale. Successivamente, si hanno processi veloci di

rilassamento vibrazionale attraverso i quali viene raggiunto il più basso livello vibrazionale di quello stesso stato.

Se a questo punto la molecola si trova ad uno stato elettronico eccitato superiore (S_2 , S_3), attraverso un processo chiamato conversione interna si riporta rapidamente allo stato di singoletto più basso, S_1 . In questa condizione la molecola può tornare allo stato fondamentale per via non radiativa, o per via radiativa con emissione di luce detta *fluorescenza* (processo radiativo tra stati della stessa molteplicità).

Una terza possibilità è che la molecola passi (intersystem-crossing) allo stato di tripletto più basso (T_1). Anche in questo caso la molecola, per tornare allo stato fondamentale, può seguire due differenti strade: la prima porta alla disattivazione per via non radiativa, la seconda invece ha come effetto l'emissione di luce: in questo caso si parla di *fosforescenza* (processo radiativo tra stati di diversa molteplicità). In figura sono riportati anche i tempi tipicamente richiesti per i processi qui elencati. Risulta evidente che il passaggio dagli stati S_1 o T_1 allo stato fondamentale è più lento del decadimento da stati superiori a S_1 e T_1 ; proprio per questo solo gli stati a più bassa energia di ciascuna molteplicità vivono abbastanza a lungo per dar luogo a processi di luminescenza o a reazioni fotochimiche.

Per una descrizione più completa della fotofisica di una molecola si può infine definire la resa quantica di emissione (Φ), che esprime il numero di fotoni emessi per ogni fotone assorbito.

$$\Phi_e = \frac{\text{[n° fotoni emessi]}}{\text{[n° fotoni assorbiti]}}$$

Caratteristica fondamentale della fluorescenza, in grado di farle ricoprire un ruolo di prim'ordine nella progettazione e sviluppo di chemosensori, è la sua elevata sensibilità: infatti la differenza tra la lunghezza d'onda di assorbimento e di quella di emissione (Stoke's shift) permette di misurare il segnale luminoso prodotto dal sensore in intervalli spettrali diversi da quelli della sorgente di eccitazione e quindi

in condizioni di bassa radiazione di fondo. Inoltre, poiché l'intero processo è ciclico (a meno di effetti di *photobleaching* che portano alla modificazione della specie allo stato eccitato), l'intensità della radiazione emessa è proporzionale a quella incidente e, dato che una singola molecola può essere ripetutamente eccitata per emettere un gran numero di fotoni rilevabili, è possibile aumentare l'intensità del segnale, e quindi operare a basse concentrazioni, semplicemente incrementando la potenza della sorgente di eccitazione.

1.4. La chimica dei sensori

Per chiarire che cosa si intende per sensore si può far riferimento alla sua definizione IUPAC: *“un sistema in grado di trasformare un'informazione chimica, che va dalla concentrazione di un singolo componente specifico del campione in analisi alla concentrazione di tutti i componenti l'intera matrice, in un segnale analiticamente utile”*⁵.

Lo sviluppo di sensori chimici sembra destinato a rivoluzionare le potenzialità nel campo delle analisi chimiche. Precedentemente infatti, la caratterizzazione da un punto di vista chimico di un sistema è stata fortemente condizionata da una serie di fattori pratici, la maggior parte dei quali correlata a questioni di tempo e di costo, e fattori che in molti casi, nel bilancio finale, possono rendere questo tipo di analisi non utilizzabili⁶.

Metodologie classiche richiedono il prelievo il trasporto ed un eventuale trattamento del campione e, in molti casi, strumentazioni costose utilizzabili solo da personale altamente specializzato. La chimica dei sensori è concepita in modo da evitare queste restrizioni e ricopre un largo campo di applicazione dove le strategie convenzionali, anche quando flessibili, risultano inadeguate. Inoltre, sensori chimici risultano di particolare interesse non solo perché economici e facili da utilizzare ma anche perché, se propriamente progettati, possono permettere il monitoraggio delle concentrazioni di una analita in tempo e talvolta in spazio

reale⁷⁻⁹. E' evidente come lo studio e la progettazione di sensori chimici ad alta efficienza richieda un approccio multidisciplinare, è infatti essenziale la cooperazione di chimici, fisici, biologi ed ingegneri. Il ruolo del chimico consiste nel progettare il sistema in funzione della matrice da analizzare, è cioè responsabile sia dello studio e realizzazione sia di quella parte di sensore che va ad interagire direttamente con l'analita di interesse, determinandone la selettività e l'affinità, sia del processo di trasduzione del segnale, che influenza fortemente la sensibilità del sistema stesso.

Tra i vari sensori chimici, quelli basati sulla fluorescenza presentano molti vantaggi: le misure di fluorescenza risultano infatti, particolarmente sensibili (in condizioni particolari è addirittura possibile monitorare la singola molecola), relativamente di basso costo, versatili, offrono una risoluzione spaziale al di sotto del micron ed una risoluzione temporale maggiore del millisecondo¹⁰⁻¹³. La versatilità di questi sistemi scaturisce da due motivi. Da una parte ci sono numerosi processi che possono essere sfruttati per modulare le proprietà fotofisiche del luminofo: trasferimento di protoni, elettroni od energia allo stato eccitato, variazioni di densità elettronica o destabilizzazione di uno stato eccitato non luminescente di tipo $n-\pi^*$ ^{11, 14-16}, formazione di eccimeri, ecc. D'altra parte si possono ottimizzare una serie di parametri del segnale in uscita per rendere più efficiente il sensore. Per esempio controllando la lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione e la finestra temporale di raccolta del segnale è possibile risolvere problemi analitici anche piuttosto complessi. Spesso le variazioni di intensità di luminescenza rappresentano l'indicazione più diretta dell'avvenuta interazione con l'analita e, dunque, il segnale da misurare. Negli ultimi tempi, tuttavia, si tende a prendere sempre più in considerazione la possibilità di basare il monitoraggio anche su altri parametri come il tempo di vita dello stato eccitato o l'anisotropia di fluorescenza, essendo questi meno influenzati dalle condizioni ambientali e sperimentali⁹.

1.5. Chimica supramolecolare e progettazione di chemosensori

Caratteristica comune ed indispensabile di tutti i sensori chimici è l'esistenza di un efficace processo di interazione nei confronti dell'analita di interesse, che deve essere legato in maniera selettiva, veloce, stabile e reversibile. Un approccio seguito dai chimici per la progettazione di nuovi e sempre più efficienti sensori chimici è basato sui principi della chimica supramolecolare^{7-9, 14, 17-19}.

Per sistema supramolecolare intendiamo un insieme organizzato di unità molecolari, dove ogni unità mantiene gran parte delle proprie proprietà intrinseche e i vari componenti sono legati tra loro tramite legami ad idrogeno, forze di Van der Waals, interazioni elettrostatiche e, seppur più raramente, legami covalenti. La caratteristica interessante dei sistemi supramolecolari è che le interazioni che esistono tra le varie subunità possono portare alla scomparsa di proprietà dei singoli componenti ed alla comparsa di proprietà nuove caratteristiche della supramolecola nel suo insieme²⁰.

Questi nuovi sistemi hanno stimolato il chimico a procedere nella costruzione di nuovi congegni, macchine e dispositivi a livello molecolare, che si ispirassero a sistemi macroscopici in grado di compiere funzioni utili²³.

Nella sua forma più semplice la chimica supramolecolare si occupa di sistemi in cui si verifica una interazione non covalente o una forma di complessazione tra una molecola (un 'host') che 'lega' una seconda molecola (un 'guest') per dare luogo ad una supramolecola di tipo 'host-guest'. Tali interazioni stanno anche alla base delle funzioni altamente specifiche che hanno luogo nei sistemi biologici, quali riconoscimento molecolare, trasporto, catalisi, etc.. Un obiettivo ambizioso è di apprendere dai sistemi naturali e di applicarne i principi ai sistemi artificiali.

Quindi i punti di forza principali dell'approccio supramolecolare allo sviluppo di sistemi complessi sono principalmente due:

- quello di ottenere strutture in cui le proprietà e le funzioni generali non siano la semplice somma di quelle appartenenti alle subunità di partenza;

- la possibilità di utilizzare processi di auto-assemblamento ed auto-organizzazione per unire le subunità che compongono il sistema (Figura 1).

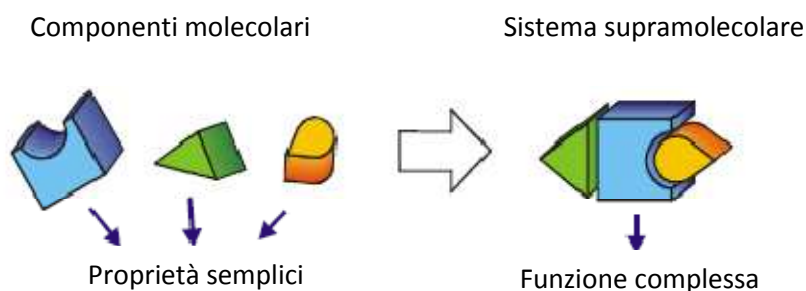


Figura 1. Dalla chimica molecolare a quella supramolecolare: subunità che svolgono funzioni semplici e supramolecola che svolge funzioni complesse

Nel corso degli anni, sono stati realizzati numerosi sistemi, anche particolarmente complessi, dotati di proprietà legate a fenomeni di riconoscimento molecolare, segnalazione, trasporto e trasformazione di specie chimiche.

La varietà dei sistemi realizzati è estremamente ampia ed il considerare supramolecolari solamente le strutture in cui l'architettura generale è formata da subunità legate da interazioni non covalenti è risultata molto velocemente una definizione troppo restrittiva. Anche specie chimiche costituite da subunità legate covalentemente possono essere considerate supermolecole, purché presentino proprietà e funzioni che le sub unità di partenza non avevano. In alcuni casi, in cui si verificano effetti cooperativi e collettivi (fotochimici, elettrochimici, coordinativi o di ripartizione), è possibile basare la definizione di sistema supramolecolare sul grado di interazioni che sono presenti tra i componenti piuttosto che sulla natura dei legami che li tengono assieme. A questo tipo di sistemi polimolecolari è stato dato il nome di "molecular assemblies"²⁴; sono caratterizzati dalla spontanea associazione di un numero anche non definito di componenti che si organizzano spontaneamente costituendo un sistema con una struttura più o meno definita a livello nanoscopico o microscopico. Le proprietà

generali di queste entità sono complessivamente legate al tipo di componenti e di organizzazione; si pensi ad esempio ai dendrimeri, agli aggregati di tensioattivi (micelle, vescicole, membrane), ai monostrati, ai film multistrato ecc.

Architetture di questo tipo stanno dando un forte contributo allo sviluppo delle nanoscienze ed alle nanotecnologie. La possibilità di intervenire e controllare la composizione e struttura di questi molecular assemblies sta aprendo la strada allo sviluppo di “Molecular Devices”, sistemi in grado di dare il trasferimento di energia, di elettroni o ioni, proprietà che possono essere utilizzate per ottenere funzioni utili come l’immagazzinamento di informazioni o la trasduzione di segnali.

1.6. Schema di un chemosensore

Come già detto, il campo articolato della Chimica Supramolecolare si va diversificando in diversi settori di ricerca quali, ad esempio, la chimica dei macrocicli e loro applicazioni, il riconoscimento molecolare, la catalisi supramolecolare, la chimica di catenani, rotaxani, dendrimeri, etc.. Tra questi, un campo di grande importanza è sicuramente quello dei sensori. Come detto precedentemente un sensore è un dispositivo in grado di trasformare un’informazione chimica (come la concentrazione di uno o più analiti) in una grandezza misurabile e analiticamente utile⁶. Sulla base di questa definizione e adottando un approccio supramolecolare per la loro realizzazione, una strada particolarmente fruttuosa si è rivelata quella di sviluppare la parte sensibile del dispositivo (quella che deve interagire con l’analita) mediante l’utilizzo di sistemi molecolari o supramolecolari composti da tre differenti componenti seguendo uno schema del tipo riportato in Figura 2.

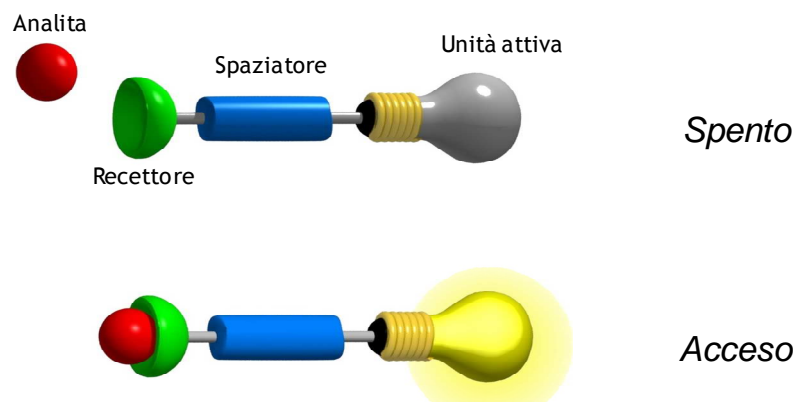


Figura 2. Rappresentazione schematica di un sensore

Una parte recettrice (responsabile dell'interazione selettiva con l'analita) ed un'unità attiva (le cui proprietà variano in conseguenza allo stato del recettore) sono legate e comunicano grazie ad uno spaziatore che controlla la geometria del sistema e ne regola l'interazione elettronica.

La parte o componente segnalatrice, che possiamo chiamare unità attiva, deve possedere una determinata proprietà rilevabile e quantificabile, come per esempio la fluorescenza o un potenziale redox, che vari a seconda dei due stati del sistema, cioè a seconda che il recettore sia libero o impegnato nell'interazione con l'analita^{7,11}.

Il sistema deve avere una serie di caratteristiche necessarie al suo funzionamento:

- il recettore deve possedere una selettività sufficientemente elevata per l'analita in esame rispetto ad agenti copresenti e possibili interferenti;
- il processo di associazione deve essere veloce e reversibile;
- l'unità attiva deve “conoscere” lo stato del recettore;
- nel suo complesso il sistema deve possedere una buona stabilità chimica.

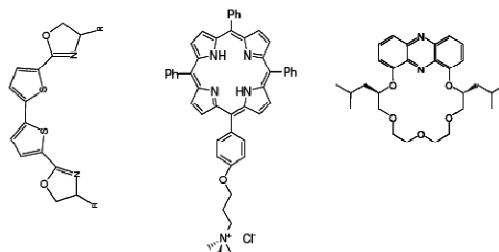
L'importanza della selettività in un meccanismo di riconoscimento si può facilmente comprendere analizzando le basi delle reazioni ed interazioni nei sistemi naturali, basti pensare alla selettività dimostrata dagli enzimi nei confronti dei loro substrati e cofattori, dalle proteine di trasporto per le sostanze che devono trasportare, dagli anticorpi verso i loro antigeni. La parte recettrice deve quindi presentare una notevole selettività in quanto in una matrice complessa deve essere in grado di riconoscere l'analita in esame minimizzando le interferenze. Negli ultimi venti anni in questo campo della ricerca si sono ottenuti importanti sviluppi. Un'altra caratteristica importante che i sensori devono possedere è la reversibilità. Considerando che pregio dei sensori è quello di poter lavorare in situ, è facile rendersi conto che se l'analita una volta riconosciuto si legasse irreversibilmente al sensore questo non sarebbe più in grado di seguire variazioni di concentrazione nel tempo.

I sensori inoltre possono essere impiegati per il monitoraggio di una determinata specie per tempi molto lunghi, è chiaro quindi come anche la stabilità di tali

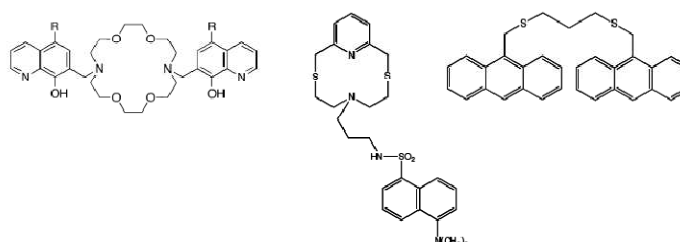
sistemi sia un parametro importante. Possiamo dire che la progettazione di sensori luminescenti, tramite le tecniche attualmente acquisite, ha ottime potenzialità. Dal momento che il chemosensore luminescente deve essere in grado di riconoscere un determinato analita tramite interazioni specifiche, che portino alla formazione di un complesso le cui proprietà di luminescenza risultino distinguibili da quelle del legante libero, il sistema più semplice per la sua realizzazione è sicuramente rappresentato dall'utilizzo di componenti fluorescenti che siano allo stesso tempo recettori. Purtroppo questo non è banale da ottenere perché introdurre modifiche per l'ottimizzazione del meccanismo di riconoscimento sullo stesso frammento della molecola che dà luminescenza generalmente ne influenza drasticamente ed in maniera indesiderabile le proprietà elettroniche.

La necessità comunque di operare separatamente sul riconoscimento e sul segnale suggerisce di confinare queste due diverse proprietà in due diversi frammenti della stessa struttura. Per questo approccio di tipo supramolecolare risulta disponibile una larghissima libreria di recettori, fotofisicamente inattivi, da poter integrare in sistemi luminescenti supramolecolari^{7-9,10,11,14,17-19,26-37}. Di seguito riporto quindi solo alcuni esempi di classi di sensori che possiamo dividere a seconda del ruolo del recettore rispetto al resto della molecola. Il recettore può essere, infatti come detto, parte integrante del sistema del fluoroforo (sensori integrati), oppure può essere un'unità indipendente e separata rispetto al fluoroforo (sensori coniugati).

Sensori integrati



Sensori coniugati



1.7. Processi legati al funzionamento dei sensori

Una caratteristica comune ed indispensabile di tutti i chemosensori è l'esistenza di un semplice ed efficace processo di coordinazione nei confronti dell'analita, che deve essere legato in modo selettivo, veloce, stabile e reversibile.

La coordinazione dell'analita da parte del recettore induce quindi, attraverso opportuni processi fotofisici, le variazioni dello spettro di emissione del sistema che costituisce il segnale rilevabile. I processi fotofisici attivi possono essere moltissimi. In questa sede verranno descritti solamente i più comuni, che sono:^{14,34,38}

- Il trasferimento elettronico fotoindotto (PET; Photoinduced Electron Transfer)
- Il trasferimento di energia promosso dalla luce (EET; Electronic Energy transfer)

1.7.1. PeT, “Photoinduced Electron Transfer”

Questo processo fotoindotto^{14,34,38-40} è alla base di un gran numero di chemosensori per cationi ed anioni, il cui funzionamento prevede in genere un'interazione elettronica a medio-lungo raggio tra recettore libero ed unità fluorescente nello stato eccitato.

Nella configurazione più diffusa la coordinazione dell'analita è segnalata dal ripristino della fluorescenza. Il sistema è costruito in modo che un gruppo funzionale all'interno del sensore (elettron-donatore) possieda un orbitale molecolare pieno con energia intermedia tra quella degli orbitali HOMO-LUMO del fluoroforo (Figura 3).

Di conseguenza, in assenza dell'analita può verificarsi un trasferimento elettronico fotoindotto dall'orbitale del gruppo donatore verso l'HOMO del fluoroforo, seguito successivamente da un secondo trasferimento elettronico dal LUMO del fluoroforo verso l'orbitale donatore. In questo modo il decadimento dello stato eccitato del fluoroforo avviene attraverso un cammino non radiativo e l'emissione dell'unità fotoattiva risulta spenta.

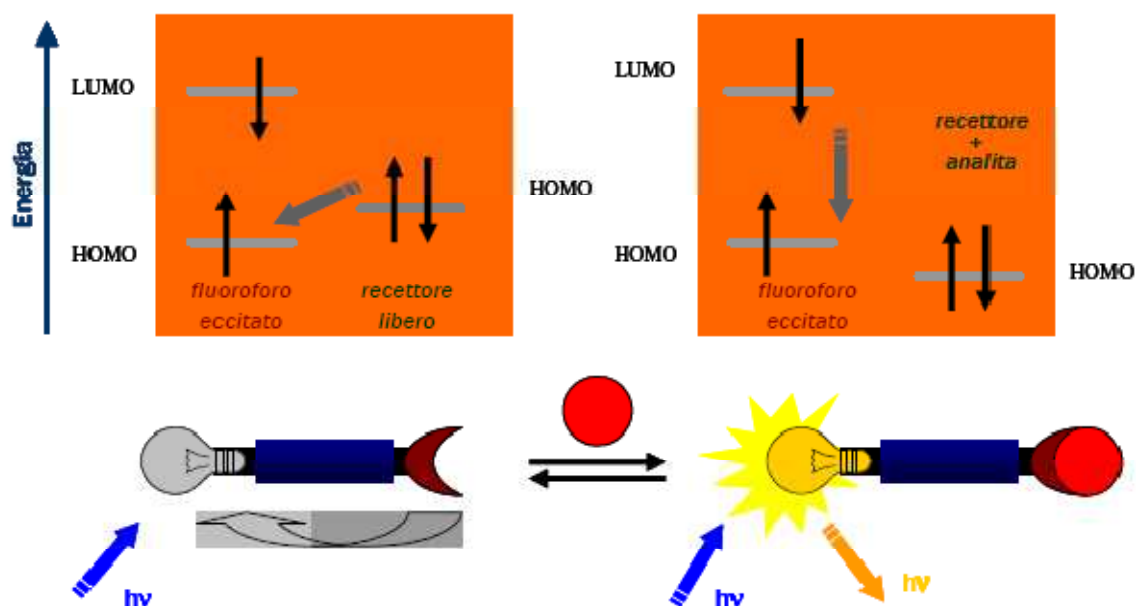


Figura 3. Schema di un sensore per ioni metallici in cui la fluorescenza è mediata attraverso PeT

Nella maggior parte dei sensori PeT i residui che agiscono da donatori e quindi spegnitori verso l'unità fluorescente sono gruppi amminici aromatici od alifatici inseriti nel recettore.

Il processo PeT viene interrotto dalla coordinazione dell'analita che induce un aumento del potenziale di ossidazione del recettore: l'energia dell'HOMO del complesso analita-recettore si abbassa e questo sfavorisce il trasferimento elettronico verso il fluoroforo.

In seguito all'interruzione del trasferimento elettronico, l'emissione di fluorescenza del sensore aumenta generando il segnale. Esistono però anche altri metodi per interrompere il processo PeT, quali cambiamenti conformazionali prodotti dalla coordinazione del substrato, legami ad idrogeno e variazioni di polarità del microambiente in prossimità del recettore.

1.7.2. PET, “Photoinduced Energy Transfer”

Anche questo tipo di meccanismo³⁹⁻⁴⁰ causa solitamente lo spegnimento dell’emissione del gruppo fluorescente e richiede l’interazione con una specie chimica che possiede orbitali molecolari vuoti o semivuoti con energia che si colloca all’interno dell’intervallo HOMO-LUMO del fluoroforo (Figura 4).

Verificate alcune condizioni⁴¹, è sufficiente che il quencher venga a trovarsi in prossimità dell’unità fluorescente, ad esempio a causa della complessazione dell’unità recettrice, perché questo processo avvenga, portando allo stato fondamentale il fluoroforo, spegnendone la luminescenza. La disponibilità di livelli energetici intermedi permette la transizione contemporanea di due elettroni tra fluoroforo eccitato e quencher e la riformazione dello stato fondamentale del fluoroforo attraverso decadimento non radiativo.

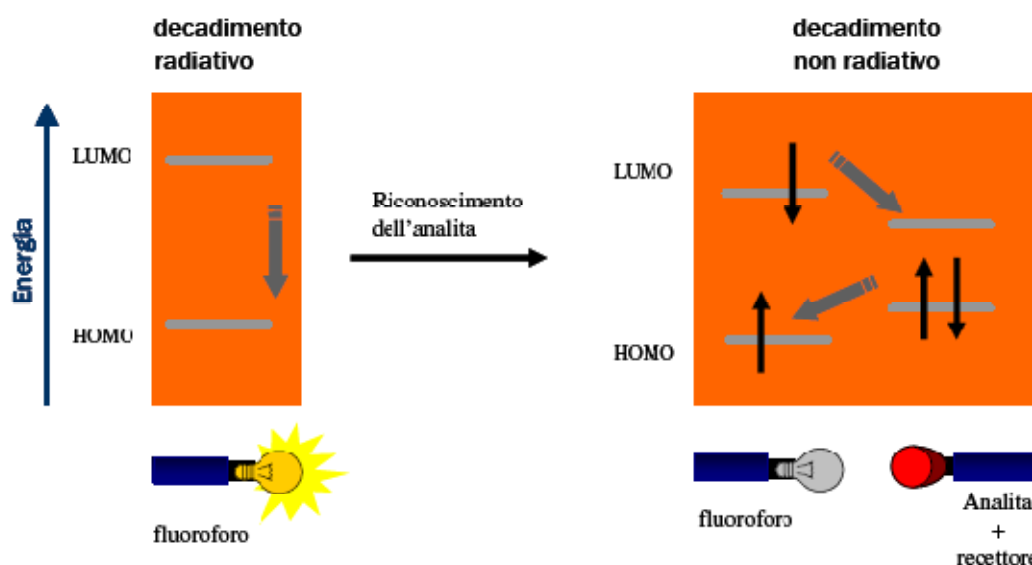


Figura 4. Schema di un sensore in cui la fluorescenza è spenta attraverso PET (Photoinduced Energy Transfer)

1.8. Uso di supporti solidi

Una volta sviluppato un sistema con tutte le caratteristiche finora individuate diventa necessario renderlo effettivamente utilizzabile come sensore. Attualmente l'impiego di sensori in soluzione risulta notevolmente limitato, ad esempio in campo biochimico ed in particolare in biologia cellulare, sensori liberi in soluzione vengono adoperati per determinare la mappatura della concentrazione di un determinato analita in tempo reale⁴². Per molte altre applicazioni sia in campo medico che ambientale, l'utilizzo di chemosensori è possibile, tuttavia, solo dopo immobilizzazione del sensore su materiale inerte. In questo modo si possono ottenere numerosi vantaggi. Innanzitutto, a patto che il legame recettore-analita sia reversibile, è possibile utilizzare la stessa superficie per effettuare più misurazioni, questo permette di abbattere notevolmente i tempi e gli sprechi di materiale per ciascuna misura, abbattendone perciò direttamente anche i costi.

Un sistema su supporto solido ha inoltre il grande vantaggio di poter essere conservato e trasportato molto agilmente e permette anche il facile inserimento in kit sempre più semplici da utilizzare e che non richiedano perciò personale altamente specializzato per effettuare le analisi.

1.9. Naso e lingua elettronici

Come detto precedentemente gran parte dello sviluppo delle tecnologie sensoristiche deve il merito alla natura, dai processi che ci circondano, infatti, l'uomo ha tratto ispirazione per la progettazione e costruzione di nuovi sensori; come per la progettazione dei cosiddetti “nasi elettronici” e “lingue elettroniche”. Ad esempio, nei primi, si mima la struttura del sistema olfattivo dei mammiferi: recettori, nervi e sistema celebrale. Allo stesso modo il naso elettronico può essere suddiviso in tre differenti componenti: il sistema di rilevazione del gas, il sistema di elaborazione dei segnali provenienti dai sensori ed il sistema di

identificazione/riconoscimento degli odori⁴³. Anche la lingua elettronica riproduce i processi che regolano l'apparato del gusto nel copro umano ed è in grado di discriminare tra sistemi multicomponente in soluzione.

A differenza dei sensori descritti precedentemente, il sistema di rivelazione di queste specie è costituito da una matrice di differenti chemosensori caratterizzati da una scarsa selettività rispetto alle sostanze di interesse, ma sensibili verso una vasta gamma di specie. Ogni sensore deve essere quindi in grado di interagire con molti composti chimici presenti nell'ambiente ma rispondere a ciascuno di essi con una sensibilità diversa conferendo alla matrice la capacità di “sentire” le diverse caratteristiche dell'atmosfera circostante in modo che la combinazione delle risposte fornisca un'immagine “olfattiva” la più completa possibile. Attualmente la maggior parte dei nasi elettronici si basa sulla rilevazione tramite micro balance al quarzo. L'apparato sensibile è costituito da una matrice di un numero definito di micro balance al quarzo ciascuna delle quali è ricoperta da un'opportuna sostanza chimica (il chemosensore), la trasduzione si basa su una variazione della frequenza di oscillazione; infatti ogni qual volta che una specie chimica presente nell'ambiente si lega reversibilmente con il sensore, determinando una variazione della frequenza del quarzo, tale variazione correttamente interpretata permette di avere informazioni relative alle specie chimiche che compongono il gas in analisi.

Attualmente, i nasi elettronici trovano impiego specialmente nel settore alimentare⁴⁴. In questo ambito sono documentate applicazioni per la verifica della freschezza di alimenti dell'industria ittica (pesce, molluschi, etc...)⁴⁵, la valutazione della stagionatura dei formaggi, il controllo dell'idoneità degli imballaggi. Di grande interesse è sicuramente uno sviluppo che riguarda l'utilizzo di questi sistemi per la valutazione della qualità di liquori, birra e vino⁴⁶. Mercati emergenti risultano, invece, quello per il monitoraggio ambientale e la medicina, esistono infatti nasi elettronici in grado di rilevare specie chimiche prodotte da batteri, come il cianobatterio per quanto riguarda applicazioni ambientali o l'*Escherichia coli* in campo medico^{47,48}. E' evidente l'importanza della possibilità di utilizzare sensori immobilizzati in matrici solide per la realizzazione di strumenti di

misura portatili ed economici, che permettano di effettuare misure in situ in tempo reale altrimenti impossibili con i normali strumenti di laboratorio.

1.10 Le nanotecnologie: le nanoparticelle

Il campo delle nanotecnologie si riferisce alla ricerca e allo sviluppo di sistemi con dimensioni nell'ordine del nanometro, tipicamente nel range fra 1 e 100 nm. Sistemi di questo tipo sono caratterizzati da nuove ed interessanti proprietà che sono conseguenza delle loro ridotte dimensioni, ed è proprio per questo che negli ultimi anni sono stati fatti grossi investimenti per finanziare la ricerca sulle nanotecnologie.^{49,50,51}

E' quindi indubbio che le nanotecnologie avranno un forte e importante impatto in molti settori della vita umana nel prossimo futuro, e molte pubblicazioni sono a testimoniare l'importanza di un approccio rigoroso e scientifico utile per sviluppare in maniera efficace questo campo di ricerca.

Una delle più importanti caratteristiche della nanotecnologia, che la rende unica, è la sua intrinseca interdisciplinarietà: al suo sviluppo infatti contribuiscono tanto la chimica quanto la fisica, la biologia e la medicina, l'ingegneria e la scienza dei materiali. In questo contesto in continuo aggiornamento, un crescente interesse è rivolto alle nanoparticelle: ovvero agli aggregati (metallici e non) con dimensioni controllabili dell'ordine del nanometro. Esistono vari tipi di nanoparticelle, si va da quelle costituite da atomi metallici a quelle costituite da semiconduttori, ma anche da quelle polimeriche a quelle miste: in generale per tutti questi aggregati ci si può ricondurre ai cosiddetti "Quantum Dots", che per comodità vengono descritti come piccole sfere con un raggio dell'ordine del nanometro, ma in realtà hanno forme che possono essere molto diverse.

Le applicazioni delle nanotecnologie, in questo momento, sono ancora molto limitate, ma per le nanoparticelle esistono già parecchi utilizzi industriali nei più disparati campi: nell'elettronica e optoelettronica; nel campo biomedico,

farmaceutico e cosmetico; nel campo della catalisi e nell'area dei materiali. Si possono ricordare inoltre molti prodotti in cui sono presenti sistemi di nanoparticelle, come ad esempio i lucidatori chimico-meccanici, nastri magnetici registrabili, gli schermi solari, alcuni prodotti del settore *automotive*, e anche supporti catalitici, marcatori biologici e fibre ottiche.

Uno dei più importanti fattori che ha reso lo studio e l'utilizzo delle nanoparticelle un settore in grande sviluppo è quello relativo al loro utilizzo nel campo dell'imaging per la diagnostica clinica e per il cosiddetto "*drug delivery*", il rilascio controllato di farmaci.

Anche la catalisi ha tratto giovamento dall'introduzione delle nanoparticelle, grazie al fatto che esse garantiscono, per via delle loro ridotte dimensioni, una grande superficie di contatto a fronte di un piccolo volume occupato. A testimonianza dell'importanza delle nanoparticelle in questo campo, esistono molte pubblicazioni.⁵²

L'incredibile versatilità e la possibilità di poter controllare le proprietà delle nanoparticelle ha quindi spinto notevolmente a portare avanti studi su questi sistemi. Già molti anni fa era stato teorizzato⁵³ che le proprietà del materiale *bulk* potessero subire grossi cambiamenti se si fossero presi in considerazione piccoli aggregati costituiti da pochi atomi. Le proprietà di questi piccoli *clusters*, caratterizzati da dimensioni nel range fra 1 e 100 nm, non dipendono esclusivamente dal materiale che li costituisce, ma sono fortemente legate alla forma, alla dimensione e all'ambiente che ne circonda la superficie. Oltretutto è possibile utilizzare diversi "*capping agents*" per derivatizzarne la superficie, e la vastità di specie chimiche che possono essere utilizzate a tal scopo rende perciò possibile il controllo di proprietà come la solubilità, oltre che l'introduzione di determinate funzionalità (come ad esempio recettori, siti reattivi, funzioni elettro e foto attive, catene di DNA).

In questo contesto estremamente vasto, nel capitolo 4 verrà focalizzata l'attenzione sulla sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle di oro che hanno mostrato proprietà di luminescenza.

1.11. Scopo della tesi

Da quanto detto fino ad ora risulta evidente come il “mondo” della sensoristica e delle nanotecnologie sia estremamente vasto, in continua evoluzione e di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuove metodiche che permettano di progettare sistemi innovativi finalizzati ad un miglioramento nella qualità della vita quotidiana, preservando però allo stesso tempo l’ambiente che ci circonda. Con questo lavoro di tesi si è cercato di dare un contributo a questo settore caratterizzando e sviluppando diversi sistemi che presentano promettenti proprietà per l’utilizzo nella realizzazione di sensori luminescenti. Le specie studiate, pur molto diverse tra loro, posseggono tutte buone caratteristiche di luminescenza ed interessanti capacità di riconoscimento più o meno selettivo di specie in soluzione o allo stato gassoso.

Si è partiti da una caratterizzazione in soluzione per poi ottimizzare il sistema e passare in alcuni casi, al fissaggio su supporti solidi in vista di future applicazioni pratiche.

1.12 Bibliografia

1. <http://www.legambientedoc.it/industria/index.html>
2. <http://www.nanodiagnosics.it>
3. Unkasevic, Miroslava; Vukmirovic, Zorka; Totic, Ivana; Lazic, Lazar. *Environmental Science and Pollution Research International* **2003**, 10(2), 89-97.
4. Ashford M W; Gottstein U. *Medicine, conflict, and survival* **2000**, 16(3), 267-80.
5. D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 121-131.
6. U. E. Spichiger-Keller, *Chemical sensors and Biosensors for Medical and Biological Application* Wiley-VCH, Berlin, **1997**.
7. *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*, (Ed. A. W. Czarnik) American Chemical Society, Washington DC, **1992**
8. M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni in: *Handbook of Photochemistry and Photochemistry and Photobiology*, Ed. M. S. A. Abdel-Mottaleb and H. S. Nalwa American Institute of Physics, **2003**, 3, 271-317.
9. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
10. *Fluorescent Chemosensors of Ion and Molecule Recognition*, Ed. J.-P. Desvergne and A.W. Czarnik, NATO-ASI Series, KluwerAcademic Publishers, Dordrecht, 1996.
11. A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J.M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice; *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1515-1566.
12. A. P. de Silva, G. D. McClean, T. S. Moody and S. M. Weir, in *Handbook of Photochemistry and Photobiology*, Ed. H. S. Nalwa, American Institute of Physics, Stevenson Ranch, CA, USA, **2003**, 3, 217.
13. L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt and P. B. Savage, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 2941.

14. L. Prodi, F. Bolletta, M. Montalti, N. Zaccheroni, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 59-83.
15. R. Y. Tsien, *Biochemistry*, **1980**, 19, 2396.
16. M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 1790-1793.
17. R. Pinalli, F. F. Nachtigall, F. Ugozzoli, E. Dal canale, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2377-2379.
18. K. D. Schierbaum, T. Weiss, E. U. Thoden van Velzen, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, W. Göpel, *Science* **1994**, 265, 1413-1415.
19. F. C. J. M. Van Veggel in: *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Ed. J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, D. N. Reinhoudt (Pergamon, Oxford, **1996**), vol. 10, 171-185.
20. V. Balzani, F. Scandola, *Supramolecular Photochemistry*; Horward: Chichester, U.K., **1991**.
21. C. O'Driscoll, *Chem. Brit.*, **2000**, 36(9), 34-37.
22. (a) D. S. Goodsell, *Our Molecular Nature: The body's Motors, Machines, and Messages*, Copernicus, New York, **1996**. (b) *Molecular Motors* (Ed.: M. Schliwa) Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
23. V. Balzani, A. Credi, F. Scandola *Chemistry and life, science and Technology*, **1996**, 78, 1221.
24. Lehn, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89-112.
25. *Molecular Luminescence Spectroscopy*, Ed. S. G. Schulman John Wiley & Sons, Inc., London, **1985**.
26. R. Krämer, , *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 772-773.
27. R. A. Bissel, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sandanayake, *Chem. Soc. Rev.*, **1992**, 21, 187-195.
28. A. P. de Silva, G. D. Mc Clean, S. Pagliari, *Chem. Commun.* **2003**, 2010-2011.
29. O. S. Wolfbeis, in: *Biomedical Optical Instrumentation and Laser-Assisted Biotechnology*, Ed. A. M. Verga Scheggi, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht **1996**.
30. L. Fabbrizzi, A. Poggi, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 197-202.

31. L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, D. Sacchi, A. Taglietti, A review, *Analyst* **1996**, 121, 1763-1768.
32. R. Bergonzoni, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, C. Mangano, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, 170, 31-46.
33. B. Valeur, E. Bardez, *Chemistry in Britain*, **1995**, 31, 216-220.
34. B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 205, 3-40.
35. E. Rimura, T. Koike, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 179-184.
36. A. B. Descalzo, R. Martinez-Manez, R. Radeaglia, K. Rurack, J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.*; **2003**, 125, 3418-3419.
37. K. Rurack, U. Resch-Genger,; *Chem. Soc. Rev.*; **2002**, 31, 116-127.
38. de Silva, A. P.; Fox D. B.; Huxley A. J. M.; Moody T. S. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 41, 205.
39. (a) Martinez-Manez, R.; Sancedon, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4419, (b) Bell T. W.; Hext, N. M. *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33 (9), 589 - 598.
40. Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Ramaioli, G.; Taglietti, A. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 85, 205.
41. (a) Foster, T. *Discuss. Faraday Soc.*, **1959**, 27,7, (b) Dexter, D.L. *J. Chem. Phys.*, **1953**, 21, 836
42. R. Y. Tsien, *Ann. Rev. Neurosci.*, **1989**, 12, 227-253.
43. (a) Gardner J. W., Bartlett P. N. : *Electronic Nose- principles and application*. Oxford University **1990**; (b) Gardner J. W., Bartlett P. N. *Sensor and Actuators B*, **1994**, 18, 120-127.
44. Bartlett P. N., Elliot J. M., Gardner J. W.: *Electronic nose and their application in the food industry*. *Food Technology*, **1997**, 51(12), 44-48.
45. Schweizer-Berberich M., Vaihinger S., Gopel W.: *Sensor and Actuators B*, **1994**, 18-19, 282-290.
46. C. Di Natale, R. Paolesse, M. Burgio, E. Martinelli, G. Panazza, A. D'amico, *Analytica Chimica Acta* **2004**, 513, 49-56.
47. Gardner J. W., Craven M., Dow C., Hines E. L.: *Meas. Sci. Technology*, **1998**, 9, 120-127.

48. Mc Entegant C. M., Penrose W. R., Strathmann S. Stetter J. R.: *Sensors and Actuators B*: **2000**, 70 (1-3), 170-176.
49. *Nanotechnology: A Realistic Market Evaluation*. Business Communication Co. Inc., Norwalk, **2004**
50. *Nanotechnology Market Opportunities, Market Forecasts, and Market Strategies*, 2004-2009. Winter Green Research, Lexington, **2004**
51. a) Storrs Hall J, *Nanofuture: what's next for nanotechnology*. Prometheus Books, New York, **2005**; b) Schulte J *Nanotechnology: global strategies, industry trends and applications*. Wiley **2005**; c) Theodore L, Kunz RG *Nanotechnology: environmental implications and solutions*. Wiley-Interscience, **2005**; d) Yao N, Wang ZL *Handbook of microscopy for Nanotechnology*. Springer, **2005**; e) Mansoori GA *Principles of Nanotechnology: molecular-based study of condensed matter in small systems*. World Scientific Publishing Co **2005**; f) Malsch NH *Biomedical Nanotechnology*. CRC Press, London **2005**; g) SR Waite *Quantum Investing: Quantum Physics, Nanotechnology, and the Future of the Stock Market*. Texere Publishing Ltd. **2004**; h) Lakhtakia A *Handbook of Nanotechnology: nanometer structure theory, modeling, and simulation*. Wiley **2004**; i) Wolf EL *Nanophysics and Nanotechnology: an introduction to modern concepts in nanoscience*. Wiley **2004**
52. a) Tsunoyama H, Sakurai H, Negishi Y, Tsukuda T *Size-specific catalytic activity of polymer-stabilized gold nanoclusters for aerobic alcohol oxidation in water*. J. Am. Chem. Soc. 127: 9374-9375 **2005**; b) Kisailus D, Najarian M, Weaver JC, Morse DE *Functionalized gold nanoparticles mimic catalytic activity of a polysiloxane-synthesizing enzyme*. Adv. Mater. 17: 1234-1239 **2005**; c) Esparza R, Ascencio JA, Rosas G, Sánchez Ramírez JF, Pal U, Perez R *Structure, stability and catalytic activity of chemically synthesized Pt, Au, and Au-Pt nanoparticles*. J. Nanoscience and Nanotechnology 5: 641-647 **2005**; d) Pasquato L, Pengo P, Scrimin P *Functional gold nanoparticles for recognition and catalysis*. J. Mat. Chem.

- 14: 3481-3487 **2004**; e) Campbell CT *Physics: the active site in nanoparticle gold catalysis*. Science 306: 234-235 **2004**; f) Meyer R, Lemire C, Shaikhutdinov KSh, Freund HJ *Surface chemistry of catalysis by gold*. Gold Bulletin 37: 72-124 **2004**; g) Haruta M *Gold as a novel catalyst in the 21st century: Preparation, working mechanism and applications*. Gold Bulletin 37: 27-36 **2004**; h) Haruta M *Catalysis by gold nanoparticles*. In: Nalwa HS (eds) Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. (vol 1) American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, California, pp 655-664 **2004**; i) Vayenas CG, Wieckowski A, Savinova ER *Catalysis and electrocatalysis at nanoparticle surfaces*. Marcel Dekker Inc **2003**
53. a) Giaever I, Zeller HR *Superconductivity of small tin particles measured by tunneling*. Phys. Rev. Lett. 20: 1504-1507 **1968**; b) Kubo R, *Electronic properties of metallic fine particles I*. J. Phys. Soc. Japan 17: 975-986 **1962**; c) Kubo R *Electronic properties of metallic fine particles*. Physics Letters 1: 49-50 **1962**; d) Fröhlich H *The specific heat of small metallic particles at low temperatures*. Physica 4: 406-412 **1937**.

CAPITOLO 2

STRUMENTAZIONE E METODI

Tutti i reagenti utilizzati sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich e utilizzati senza ulteriore purificazione. I solventi utilizzati per le misure fotofisiche sono Merk-Uvasol per spettroscopia. I composti studiati sono stati caratterizzati dal punto di vista fotochimica e fotofisico mediante la strumentazione e le tecniche descritte nei paragrafi seguenti.

2.1 Spettri di assorbimento elettronico

Gli spettri di assorbimento elettronico sono stati registrati mediante lo spettrofotometro a doppio raggio UV/VIS Perkin Elmer λ -40 il cui principio di funzionamento è illustrato in Figura 1.

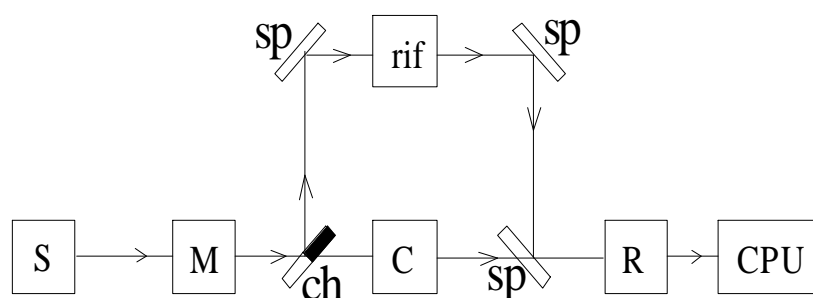


Figura 1. Schema a blocchi dello spettrofotometro UV-vis Perkin Elmer λ -40.

S = sorgente (una lampada a tungsteno opera tra 900 e 320 nm, una ad idrogeno tra 320 e 190 nm); M = monocromatore (reticolo di diffrazione); C = campione; rif = riferimento; R = rivelatore (tubo fotomoltiplicatore); ch = chopper; sp = specchi; CPU = computer (l'intensità del segnale viene misurata dal fotomoltiplicatore e registrata sull'asse y, la scansione alle varie lunghezze d'onda viene fatta dal monocromatore e registrata sull'asse x).

Mediante queste misure è possibile identificare le transizioni elettroniche che portano la molecola dallo stato fondamentale a vari stati eccitati; inoltre, è possibile risalire all'intensità della transizione calcolando il coefficiente di estinzione molare ϵ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] secondo la relazione:

$$A = \epsilon bc$$

dove A è l'assorbanza (misurata dallo strumento), b è lo spessore della soluzione attraversata dal raggio analizzante (di solito 1cm) e c è la concentrazione del campione in esame.

2.2 Spettri di emissione ed eccitazione

Gli spettri di emissione sono stati registrati mediante uno spettrofluorimetro Perkin Elmer LS50 del quale viene riportato lo schema ottico in Figura 2.

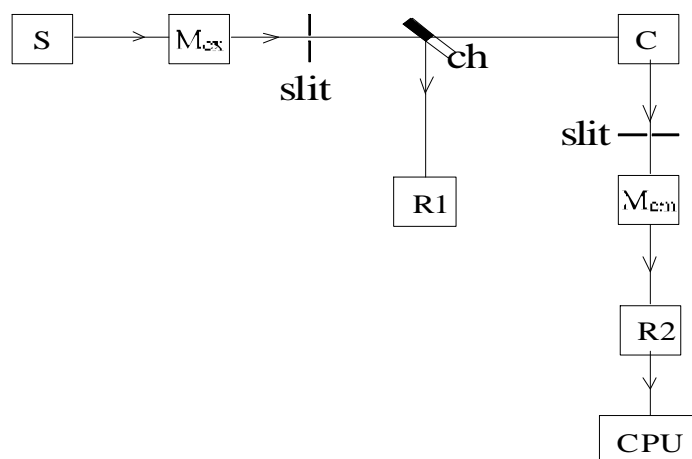


Figura 2: Schema a blocchi di uno spettrofluorimetro Perkin Elmer LS50.

S = sorgente (lampada allo Xe con impulsi di 2 μs e frequenza di 50 Hz); Mecc = monocromatore di eccitazione; Mem = monocromatore di emissione; R1 = fotomoltiplicatore di riferimento (per correggere lo spettro di emissione della lampada); R2 = fotomoltiplicatore (per la rilevazione del segnale di emissione dell'analita); C = campione; ch = chopper; slit = fenditure.

Con questo strumento è possibile evidenziare le transizioni di tipo radiativo (che avvengono cioè con emissione di un fotone) di una molecola che passa da uno stato eccitato (solitamente quello a più bassa energia) allo stato fondamentale. Inoltre, regolando il ritardo con cui viene fatta la misura rispetto all'impulso della lampada, è possibile separare la fluorescenza dalla fosforescenza.

Contrariamente a quanto avviene per gli spettri di emissione in cui si fissa la lunghezza d'onda di eccitazione e si effettua la scansione del monocromatore di emissione, per effettuare uno spettro di eccitazione, il monocromatore di emissione è posto a lunghezza d'onda fissa (di solito la lunghezza d'onda del massimo di emissione), mentre quello di eccitazione effettua la scansione che viene registrata sull'asse x. Di seguito vengono riportati gli schemi ottici dei due metodi di indagine a confronto (Figura 3).

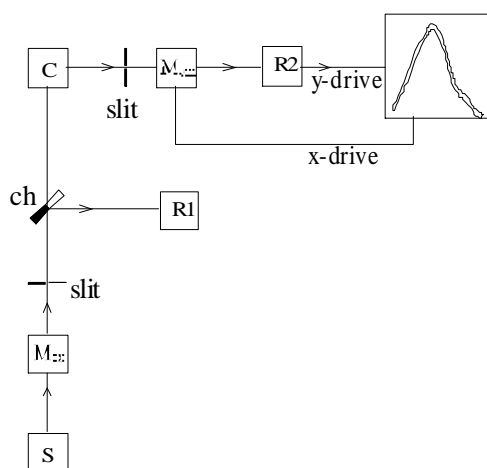


Figura 3(a): Spettro di emissione

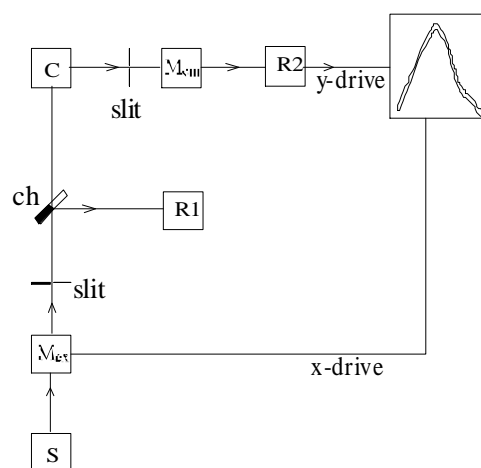


Figura 3(b): Spettro di eccitazione

Inoltre, per ottenere uno spettro corretto, si deve utilizzare una concentrazione di analita tale che la sua assorbanza A sia minore di 0.1 in tutto l'intervallo di lunghezze d'onda utilizzato per lo spettro di eccitazione. In questo modo la risposta dello strumento in intensità di emissione I_{em} è lineare con il valore di A e lo spettro che si ottiene, nel caso in cui tutti gli stati eccitati a più alta energia si riportino allo stato eccitato emittente con efficienza unitaria, risulta proporzionale allo spettro di assorbimento.

2.3 Misure di tempi di vita di stati eccitati emittenti

Per le misure dei tempi di vita, date le caratteristiche del fluoroforo in esame, è stato utilizzato lo strumento detto “fotone singolo” (single photon counter) il cui range di misura si estende su tempi di vita da 0.5 ns a 1 ms.

Lo schema dello strumento è rappresentato in Figura 4.

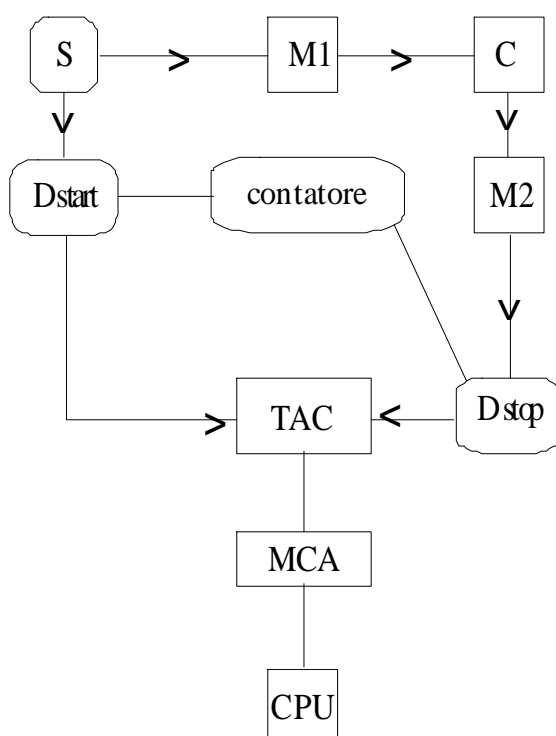


Figura 4: Schema a blocchi del fotone singolo.

S= sorgente, M1 = monocromatore di eccitazione, M2 = monocromatore di emissione, C = campione, Dstart = fotomoltiplicatore di start, Dstop = fotomoltiplicatore di stop, TAC = convertitore tempo-ampiezza, MCA = analizzatore multicanale, CPU = computer.

Una lampada a gas, contenente H₂, D₂, o N₂ con P = 0,5 atm genera impulsi di luce con circa 2 ns di ampiezza e ad una frequenza di 40 KHz. La lunghezza d'onda di eccitazione può essere selezionata con monocromatori o filtri ottici. Misurando il ritardo con cui i fotoni arrivano al rivelatore (fotomoltiplicatore) rispetto ai corrispondenti impulsi di eccitazione ed accumulando questi segnali in vari canali a

seconda dei loro ritardi si può costruire la curva di decadimento dell'emissione e risalire così al tempo di vita cercato. Il ritardo di ogni segnale rispetto al flash di eccitazione viene stimato in base al valore di una tensione che cresce linearmente col tempo. L'errore associato al tempo di vita è di circa $\pm 10\%$.

2.4 Misure dei rendimenti quantici di emissione

Una grandezza molto usata in fotofisica è il rendimento quantico di emissione Φ_e , che può essere definito come il rapporto tra il numero di fotoni emessi e il numero di fotoni assorbiti:

$$\Phi_e = \frac{[\text{n}^\circ \text{ fotoni emessi}]}{[\text{n}^\circ \text{ fotoni assorbiti}]}$$

I rendimenti quantici di emissione Φ_e sono stati determinati confrontando l'intensità di emissione delle specie in esame con quella di opportuni standard di riferimento a rendimento quantico noto, operando nelle stesse condizioni sperimentali su di uno spettrofluorimetro Perkin Elmer LS50.

Sono stati registrati gli spettri di emissione del campione e dello standard usando una lunghezza d'onda di eccitazione alla quale le soluzioni sono isoassorbenti. La relazione che permette di calcolare il rendimento quantico di luminescenza è:

$$\Phi_x = \Phi_{st} \cdot \frac{A_x}{A_{st}} \cdot \left(\frac{n_x}{n_{st}} \right)^2$$

Φ_x = rendimento quantico di emissione della specie X;

Φ_{st} = rendimento quantico di emissione dello standard;

A_x = area della banda di emissione della specie X;

A_{st} = area della banda di emissione dello standard;

n_x = indice di rifrazione del solvente in cui è disciolta la specie X;

n_{st} = indice di rifrazione del solvente in cui è disciolto lo standard.

Per avere la stessa risposta del fototubo, è necessario che la zona spettrale di emissione del composto di riferimento sia la stessa di quella del campione.

2. 5. Deposizione di film su vetro

La deposizione su vetrino di film è stata fatta usando lo SpinCoater Model P6700. Lo Spin Coater è uno strumento relativamente semplice, costituito da un piccolo supporto rotante forato al centro; attraverso questo foro viene fatto il vuoto in modo da tenere il substrato da ricoprire aderente al supporto stesso. L'operazione di spincoating consiste nel depositare in maniera uniforme sul substrato inerte un'aliquota di soluzione e, grazie alla forza centrifuga dovuta alla rotazione del supporto, si ottiene una ricopertura uniforme della superficie. Lo strumento permette di controllare sia la velocità che la durata della rotazione nell'intervallo fra 500-8000 giri/min e 0/60 sec.

Questo metodo permette quindi di ottenere film con spessori da circa 100 nm fino a 10 micron. La schematizzazione del processo è riportata in Figura 5.

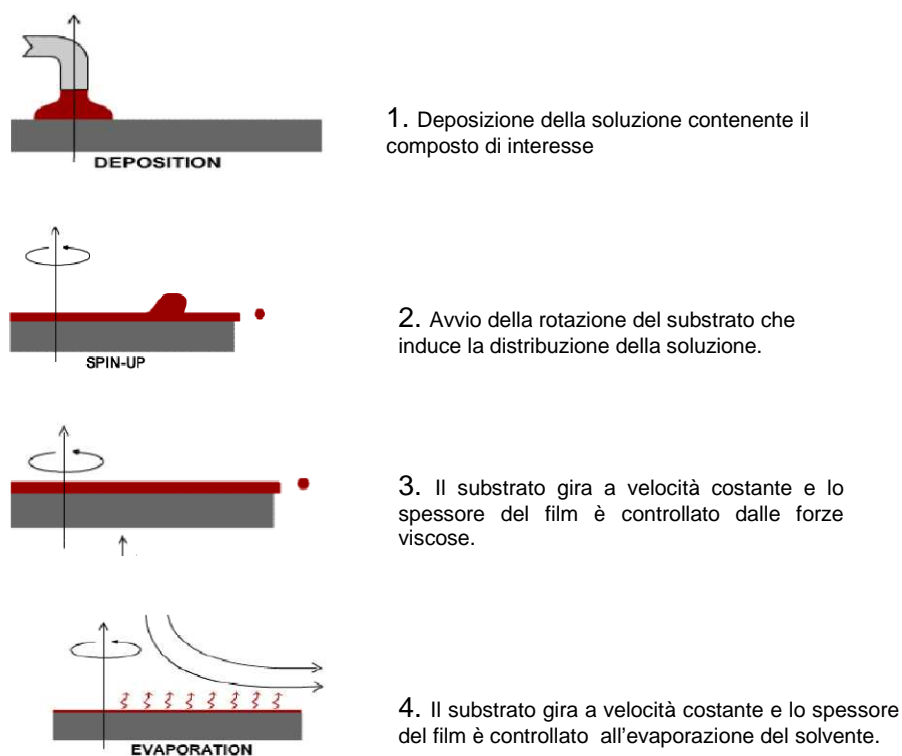


Figura 5. Schema di procedura per l'utilizzo dello spin-coater

Il trattamento matematico del sistema impone il bilanciamento tra le forze viscosi e la forza centrifuga. In più è necessario tenere conto che, a causa dell'evaporazione del solvente, la viscosità varia nel tempo. La formula finale è:

$$h_f = c_0 \cdot \left(\frac{e}{2 \cdot (1 - c_0) \cdot K} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Dove:

h_f = spessore del film

c_0 = concentrazione di solido nella soluzione

e = velocità di evaporazione = $C \cdot \sqrt{\omega}$

$$K = \frac{\rho \cdot \omega^2}{3\eta}$$

ρ = densità del solvente

ω = velocità angolare del substrato

η = viscosità del solvente

2. 6 Bibliografia

1. Ramachandra Rao, C. N.; Kulkarni, G. U.; Thomas, P. J.; Edwards, P. P. Chem. Soc. Rev., **2000**, 29 (1), 27 - 35.
2. Grunes, J.; Zhu, J.; Somorjai, G. A. Chem. Commun. **2003**, 18, 2257.
3. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **1999**

CAPITOLO 3

SENSORI FLUORESCENTI PER ANALITI GASSOSI

3.1 Cavitandi fluorescenti: l'idea

In questo capitolo, verranno descritte la sintesi e il principio di funzionamento di una nuova classe di recettori molecolari basati su proprietà luminescenti, ovvero di una coppia di *cavitandi fosfonati* (composti 1 e 2 di figura 3.1) che rispondono all'interazione con un determinato analita variando le loro caratteristiche fotofisiche, mentre risultano totalmente insensibili nei confronti di interazioni di natura aspecifica.

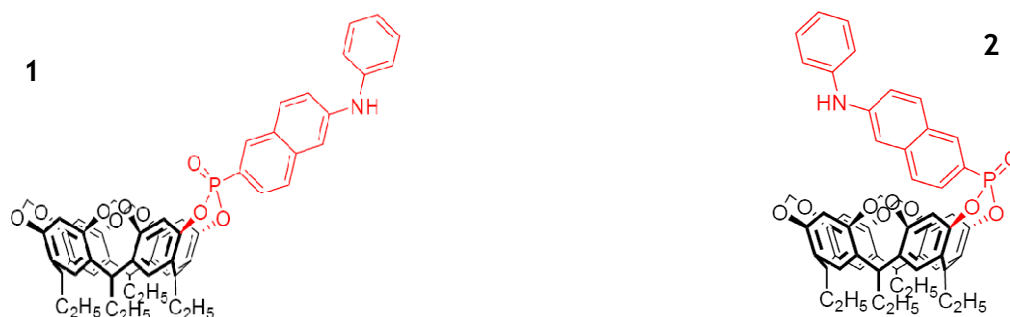


Figura 3.1. Cavitandi fluorescenti: isomero IN, a sinistra, ed isomero OUT, a destra.

I cavitandi fosfonati sono stati sintetizzati con il proposito di trovarne un utilizzo nel campo della *determinazione di alcoli a catena corta* all'interfaccia solido-gas. Alla base della scelta dei cavitandi fosfonati c'è la forte propensione al legame ad idrogeno fra la funzione alcolica e il gruppo P=O, e il fatto che l'instaurarsi di

questo tipo di interazione possa riflettersi sulle proprietà luminescenti del fluoroforo a cui il gruppo $P=O$ è connesso, fornendo il segnale utile per segnalare l'avvenuta interazione.

Per meglio spiegare questo concetto, basta prendere in considerazione la fotofisica del fluorescente legato alla cavità (unità rossa di figura 3.1): un doppio anello aromatico (naftalene) direttamente legato al gruppo $P=O$ da una parte e ad un'ammina sostituita dall'altra.

Conseguentemente all'eccitazione del naftalene con un fotone di adeguata energia, un elettrone del doppietto dell'azoto viene trasferito al sistema aromatico. Il carattere elettrone-attrattore esercitato dal gruppo $P=O$ fa sì che questo elettrone sia più probabilmente localizzato vicino al nucleo del fosforo, dando luogo così ad uno stato eccitato, cosiddetto a *trasferimento di carica*, che decade con tempo di vita τ che è tipicamente nell'ordine dei nanosecondi, ed è decisamente influenzato da due fattori fondamentali:

1. La polarità del solvente: più polare è il solvente più lo stato eccitato a trasferimento di carica risulta essere stabilizzato per solvatazione. Come risultato di questo potrebbe aversi un allungamento del tempo di vita e una emissione di energia a lunghezze d'onda maggiori (energia minore);
2. La perturbazione del gruppo $P=O$ direttamente legato al doppio anello aromatico: se, ad esempio, esso si trova impegnato in un legame ad idrogeno, il suo carattere elettrone-attrattore aumenterà e come conseguenza di questo si avranno variazioni nella disattivazione dello stato eccitato, sia dal punto di vista cinetico che termodinamico.

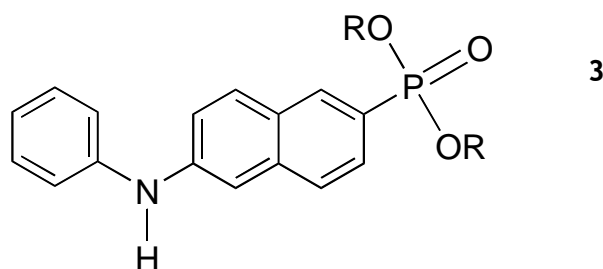


Figura 3.2. Di ethyl 6-(phenylamino)naphthalen-2-phosphonate (composto 3)

Con queste premesse, risulta chiaro come un'eventuale interazione della specie **3** di figura 3.2. con un alcol, per mezzo della formazione di un legame ad idrogeno fra il gruppo $P=O$ e una funzione alcolica, possa essere ben caratterizzabile dal punto di vista fotofisico.

Si è scelto di collegare direttamente questo fluorescente ad una cavità resorcinarenica come quella dei composti **1** e **2** per riuscire ad avere un controllo sulla struttura dell'alcol che va ad interagire con il gruppo $P=O$ (esistono in letteratura evidenze che attribuiscono a cavità di questo tipo una spiccata affinità e quindi selettività nei confronti delle catene alchiliche a basso numero di carboni, come quella dell'etanolo).

L'obiettivo è quindi quello di ottenere due cavitandi fosfonati:

- PO_{in} (composto **1**): l'ossigeno del gruppo $P=O$ punta verso l'interno della cavità;
- PO_{out} (composto **2**): l'ossigeno del gruppo $P=O$ punta verso l'esterno della cavità.

Nell'isomero IN si hanno le condizioni ottimali affinché l'interazione con la funzione alcolica avvenga, mentre nel caso dell'isomero OUT l'effetto sinergico delle due forze alla base della complessazione (formazione del legame ad idrogeno e interazione π -alifatica fra l'interno della cavità e la catena corta dell'alcol) non

sussiste. Schematicamente si possono rappresentare le parti di cui il sensore è composto come in figura 3.3:

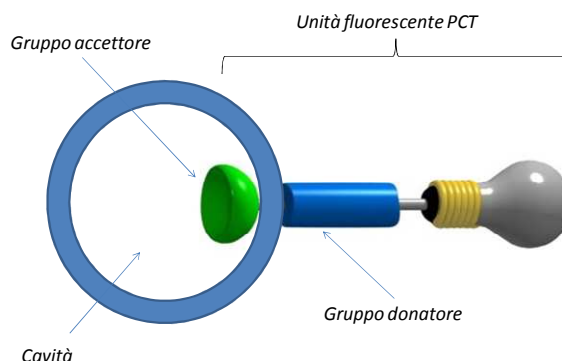


Figura 3.3 Schematizzazione del sensore fluorescente PCT basato su un cavitando fosfonato

L'approccio adottato è stato quindi quello di sintetizzare separatamente le diverse parti che lo compongono per poi unirle. Come risulta dalla schematizzazione di figura 3.3, le parti fondamentali che costituiscono il sensore sono due:

- La cavità
- L'unità fluorescente

3.2 Misure in soluzione

Per valutare la capacità di riconoscere gli alcoli a catena corta dei cavitandi così sintetizzati, sono state eseguite titolazioni fluorimetriche con etanolo (figura 3.4). Per stabilire quanto l'affinità della cavità resorcinarenica verso le catene alchiliche influisca sulla formazione dell'addotto alcool-cavitando sono state condotte titolazioni analoghe anche sul composto di figura 3.2, in cui la formazione del legame ad idrogeno fra il gruppo $P=O$ e la funzione alcolica è l'unica interazione possibile. Tutte le titolazioni sono state eseguite in due differenti solventi a diversa polarità, l'acetonitrile e il cloroformio, per comprendere meglio l'effetto della solvatazione.

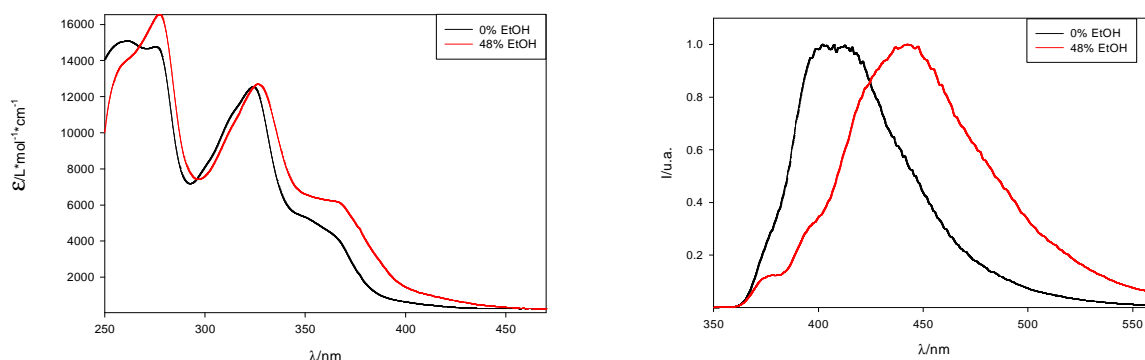


Figura 3.4. Spettri di assorbimento (a sinistra) ed emissione (a destra) dell'isomero POin in CHCl_3 . Il profilo nero è nel solo solvente di riferimento, mentre in rosso si ha un 50% di EtOH.

Le variazioni osservate negli spettri di assorbimento ad inizio titolazione (0% di EtOH) e a fine titolazione (ca. 50% di EtOH) possono essere attribuite, in tutti e tre i casi (POin, POout e composto modello) a variazioni nella solvatazione dello stato fondamentale. Ovviamente per il solvente iniziale meno polare (il cloroformio), sono state osservate variazioni più significative in corrispondenza dell'aumento di polarità del mezzo a causa dell'aggiunta di EtOH.

Lo spettro di emissione, come aspettato, subisce uno spostamento del massimo verso lunghezze d'onda maggiori (energie minori) come conseguenza della migliore solvatazione dello stato eccitato a trasferimento di carica, oltre che della formazione del legame ad idrogeno fra l'unità $\text{P}=\text{O}$ e la funzione alcolica. Ovviamente in soluzione, data l'elevata concentrazione di EtOH, l'effetto relativo alla solvatazione risulterà essere predominante, mentre quando verrà discusso il comportamento di questo sistema all'interfaccia solido-gas maggiore importanza rivestirà la formazione del legame ad idrogeno.

Sono state effettuate anche misure di tempo di vita e rendimento quantico per i tre composti, riassunte nella figura 3.5.

Tempi di vita dello stato eccitato				
Solvente	Composto			
	Modello	PO _{in}		PO _{out}
CHCl ₃	2	3.2		3.1
CHCl ₃ +EtOH	6.2	2.1	6.4	2.6 6
Rapporto		1	:	8 1 : 1.25
Composto	Rendimento quantico in CHCl ₃			
Modello	1			
PO _{in}	1			
PO _{out}	0.5			

Figura 3.5. Tempi di vita e rendimenti quantici del composto modello e dei due cavitandi.

Esaminando innanzitutto i valori dei rendimenti quantici delle tre specie, si può notare come il composto modello e il cavitando IN abbiano lo stesso valore di ϕ , che è doppio rispetto a quello del cavitando OUT.

Alla luce di questo, si possono normalizzare per i rendimenti quantici iniziali gli andamenti delle intensità di emissione registrate a 490 nm durante le tre titolazioni con EtOH in CHCl₃. Nel grafico di figura 3.6. vengono rappresentate le tre curve così ottenute.

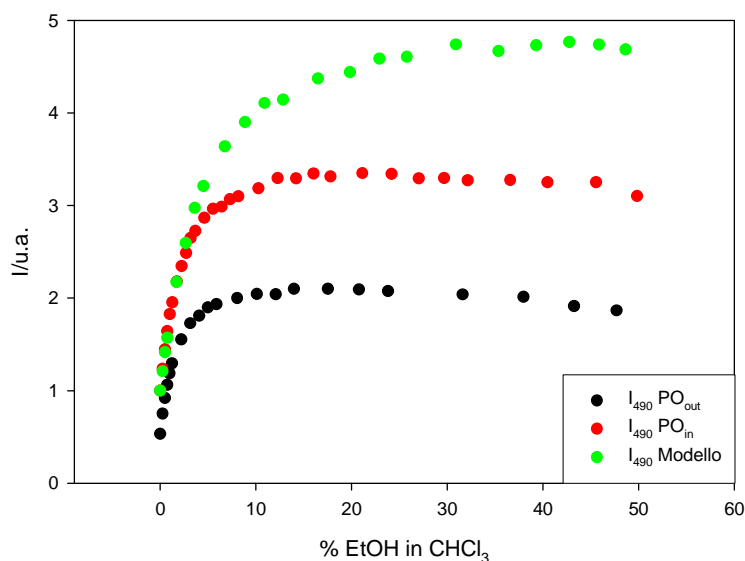


Figura 3.6. Andamento dell'intensità di emissione del composto modello e dei cavitandi IN e OUT in funzione della % di EtOH nel solvente.

La prima cosa che si nota è che la pendenza con la quale gli isomeri IN e OUT raggiungono il plateau a cui compete il valore massimo di I_{em} è la stessa, diversa però da quella che caratterizza il modello. Questo induce a pensare che in soluzione la differente orientazione del gruppo $P=O$ non sia rilevante ai fini dell'interazione con l'alcol, rendendo perciò la presenza della cavità ininfluenta. Questo è ragionevole se si considera che la concentrazione di EtOH risulta essere molto maggiore rispetto a quella di cavitando ($ca. 10^{-4}M$).

Per il composto modello invece, la pendenza è lievemente più bassa, ma il valore di I_{em} raggiunto al plateau risulta essere maggiore. La pendenza è un indice della costante di associazione, mentre l'intensità di emissione raggiunta da un'idea di quanto lo stato eccitato emittente differisca dallo stato fondamentale. In altre parole, si può dire che il composto modello sia in grado di associarsi all'etanolo in maniera meno efficiente rispetto ai cavitandi, ma il suo stato eccitato risulta essere più differente da quello fondamentale.

A conferma di quanto detto sopra, si può notare come l'aumentata polarità del solvente comporti, per tutte e tre le specie, un generale allungamento del tempo di vita dello stato eccitato.

Osservando i singoli valori di τ , si può notare come, mentre per il composto modello si passa da un decadimento monoesponenziale di 2 ns ad uno di 6, nel caso dei due cavitandi si passa da un tempo di vita di circa 3 ns ad un decadimento multiesponenziale, che è stato ragionevolmente fittato con due tempi di vita, uno assimilabile con quello del composto modello in cloroformio, mentre l'altro risulta del tutto confrontabile con i 6 ns rilevati nel caso del solvente misto. Se si prendono in considerazione ora i rapporti fra le concentrazioni degli stati eccitati a tempo di vita corto e a tempo di vita lungo per i due cavitandi (ricavati dalle equazioni di fitting dei decadimenti) è possibile osservare come nel caso del cavitando IN sia predominante la specie che decade dopo 6 ns (rapporto 1: 8),

mentre nel caso del cavitando OUT i due decadimenti abbiano sostanzialmente lo stesso peso (rapporto 1: 1,25).

Riferendosi quindi al composto modello, ed immaginando che il suo stato eccitato sia solvatato al “100%” si può, con le approssimazioni del caso, definire lo stato eccitato di IN come solvatato all’88%, mentre quello del cavitando OUT come solvatato al 55%, osservazione che si trova in accordo con la differente struttura delle due specie.

3.3 Il sensore.

Per poter utilizzare i cavitandi come sensori all’interfaccia solido-gas, è necessario che essi vengano depositi su una superficie inerte.

Il supporto sul quale si effettua la deposizione deve possedere caratteristiche tali da essere trasparente per il range di lunghezze d’onda di interesse, che per il caso dei cavitandi corrisponde al visibile. Per questo il materiale che più soddisfa queste condizioni risulta essere il vetro.

Utilizzando la tecnica di spincoating, sono stati così creati film sottili dei cavitandi e del composto modello in matrice polimerica (figura 3.7).

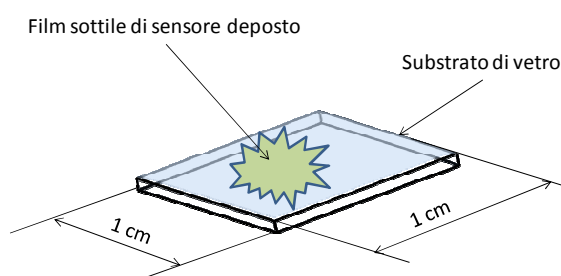


Figura 3.7. Rappresentazione dello strato sottile depositato su supporto inerte.

Una matrice piuttosto comune utilizzata per la creazione di film trasparenti è il Polvinil Cloruro (PVC). La T_g di 80°C del PVC suggerisce l'utilizzo di un plastificatore per ridurla, al fine di poter creare fare film trasparenti e nello stesso tempo “permeabili” agli analiti. E' molto diffuso, sia in campo medico che biologico, l'utilizzo di diottil-sebacato (figura 3.8) come plastificatore perché possiede le necessarie caratteristiche di trasparenza richieste per questo tipo di matrice.

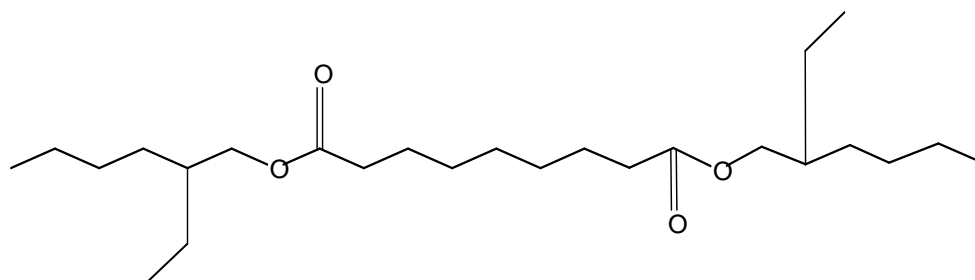


Figura 3.8. Di-ottil sebacato.

La strategia sintetica che ha portato alla creazione dei film sottili è perciò quella riportata nello schema 3.12.

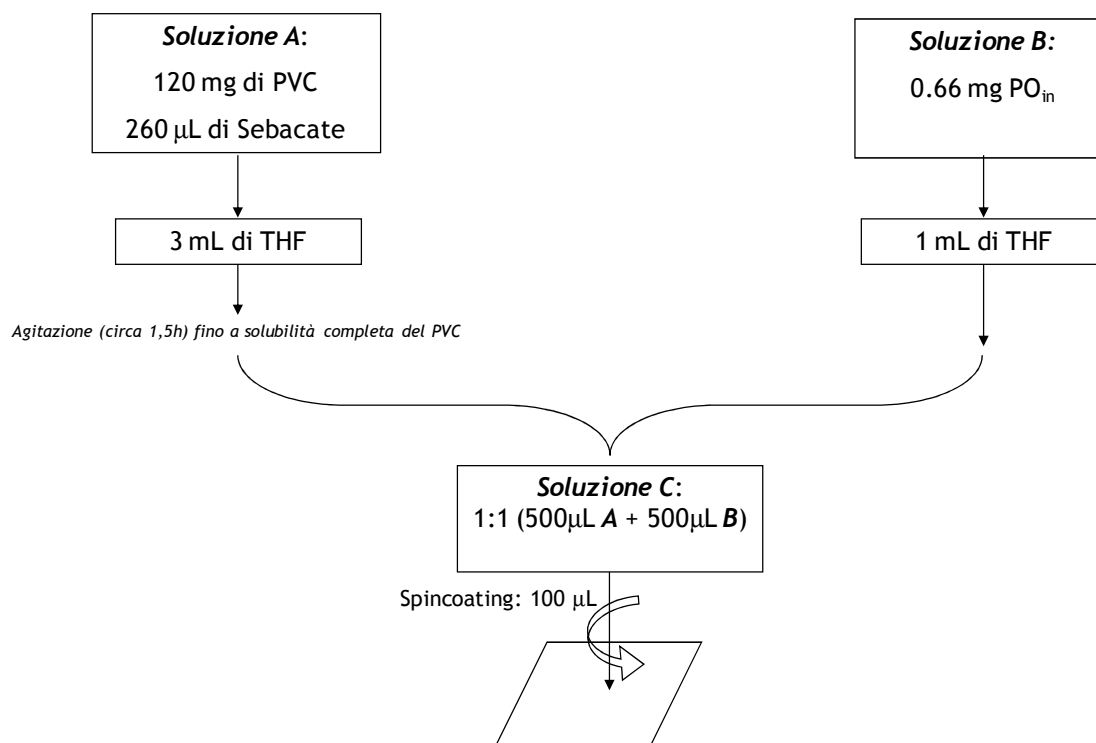


Figura 3.9. Strategia sintetica per i film di cavitando in matrice polimerica.

Il vetrino che si ottiene, oltre ad essere permeabile al gas e agli analiti, risulta così rivestito nella sua superficie con un materiale incolore, flessibile e adesivo in maniera uniforme ed omogenea al supporto. La molecola attiva (i cavitandi IN e OUT e il composto modello) sono stati aggiunti in modo tale da avere una concentrazione nell'ordine di 0.1-0.2% in m/m, limite massimo oltre il quale il segnale di fluorescenza causa la saturazione del detector dello spettrofluorimetro.

3.4 Setup strumentale

Per testare il sensore, risulta necessario mettere in contatto lo strato sottile con gli analiti e nello stesso tempo eccitare il fluoroforo e registrare il suo spettro di emissione.

E' stata così concepita una cella a flusso *ad hoc* montata su una piattaforma tale da essere facilmente montata sullo spettrofluorimetro a disposizione, il Perkin Elmer LS55 (figura 3.10).

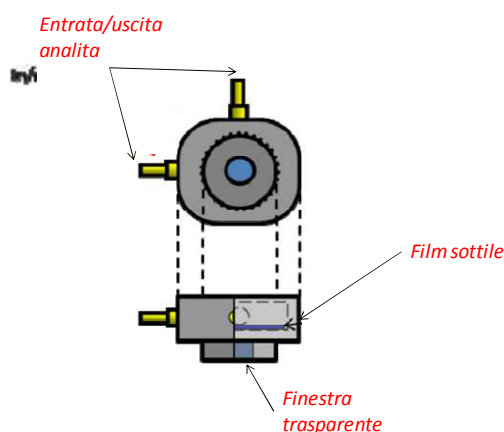


Figura 3.10. Cella a flusso: fotografia (a sinistra) e rappresentazione grafica (a destra)

Il substrato viene così posto nella finestra della cella (la tenuta del sistema è garantita da opportune guarnizioni), che a sua volta è posta nella geometria

ottimale per lo spettrofluorimetro, con un angolo di inclinazione di 40° rispetto alla luce incidente (figura 3.11).

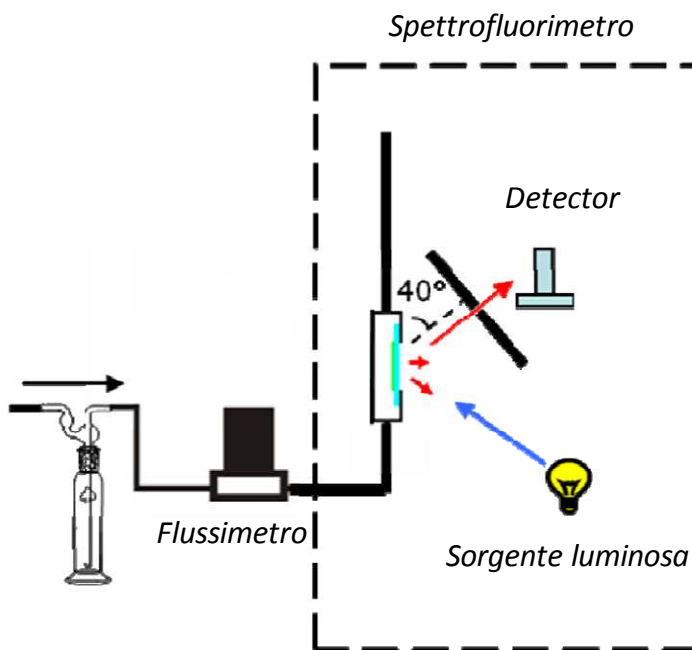


Figura 3.11. Rappresentazione del setup strumentale.

3.5 Misure all'interfaccia solido-gas.

Le prime misure sono state effettuate utilizzando un'alta concentrazione di EtOH diluito con azoto (circa 10000 ppm). Lo scopo dei primi esperimenti era di testare quelle che sono le caratteristiche fondamentali di un sensore: la sensibilità e la riproducibilità. Sono così state condotte, in matrice polimerica, prove analoghe per i due cavitandi e il composto modello.

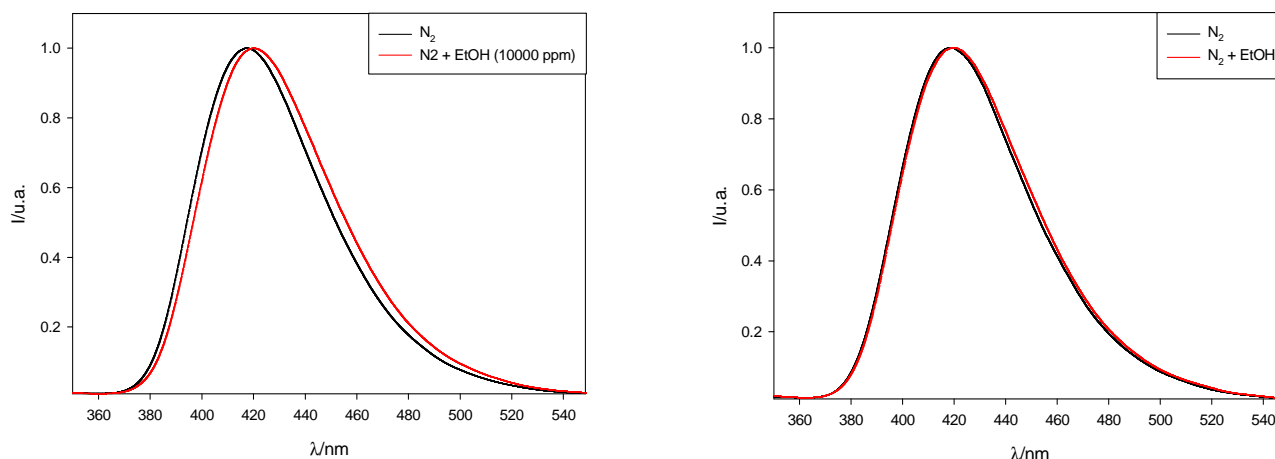


Figura 3.12. Spettri di emissione del cavitando IN (a sinistra) e OUT (a destra) sotto flusso di N₂ (linea nera) e N₂ + EtOH (10000 ppm).

Dalla figura 3.12 risulta netta la differenza con quanto osservato in soluzione. Anche in questo caso si ha un red-shift del massimo di emissione, ma di entità minore. Questo è dovuto al fatto che in soluzione gran parte di questo effetto è attribuibile al contributo offerto dalla solvatazione del sistema con etanolo. Allo stato solido questo contributo viene completamente a mancare e l'unico fenomeno in grado di far sì che si abbiano le modificazioni dello stato eccitato che portano allo spostamento dell'emissione è la formazione del legame ad idrogeno fra il gruppo P=O e la funzione alcolica dell'etanolo.

Il confronto delle due coppie di spettri di emissione di figura 3.12 fornisce pertanto una prova del fatto che la differente orientazione del gruppo P=O conferisce alle specie PO_{in} e PO_{out} una diversa sensibilità nei confronti dell'analita di interesse. Limitatamente alle sole misure in soluzione, non era possibile fare un'affermazione del genere, in quanto per entrambi i cavitandi si osservava lo stesso red-shift. Il fatto di aver eliminato “l'interferenza” dovuta alla solvatazione, che copriva il segnale dovuto puramente all'interazione fra analita e cavità, fa sì che ora la formazione del legame ad idrogeno giochi un ruolo fondamentale nel riconoscimento dell'analita.

Volendo fare un paragone, si può immaginare il cavitando come un cestino, in cui la parte del coperchio è interpretata dall'unità fluorescente. Quando il coperchio è aperto (PO_{in}), la cavità risulta accessibile all'etanolo e viene fornito un segnale che ne evidenzia la presenza, mentre a coperchio chiuso (PO_{out}), la cavità non è più accessibile e non viene fornita alcuna risposta.

E' molto importante ricordare che nella chimica dei sensori è fondamentale che esista una molecola di riferimento strutturalmente simile al sensore ma insensibile all'analita. Per meglio comprendere e quantificare il processo di riconoscimento è perciò opportuno riportare le misure ad uno "zero". In questo caso, la differente orientazione del gruppo $P=O$ (responsabile della formazione del legame ad idrogeno) rispetto alla cavità, fa sì che il cavitando PO_{out} ben rappresenti il suddetto "zero".

Per mettere in evidenza questo concetto, in figura 3.13 viene mostrato l'andamento in funzione del tempo dell'intensità di emissione a 460 nm che deriva dall'eccitazione a 333 nm di due film sottili di PO_{in} e PO_{out} , registrata con la funzione "time-drive" dello spettrofluorimetro.

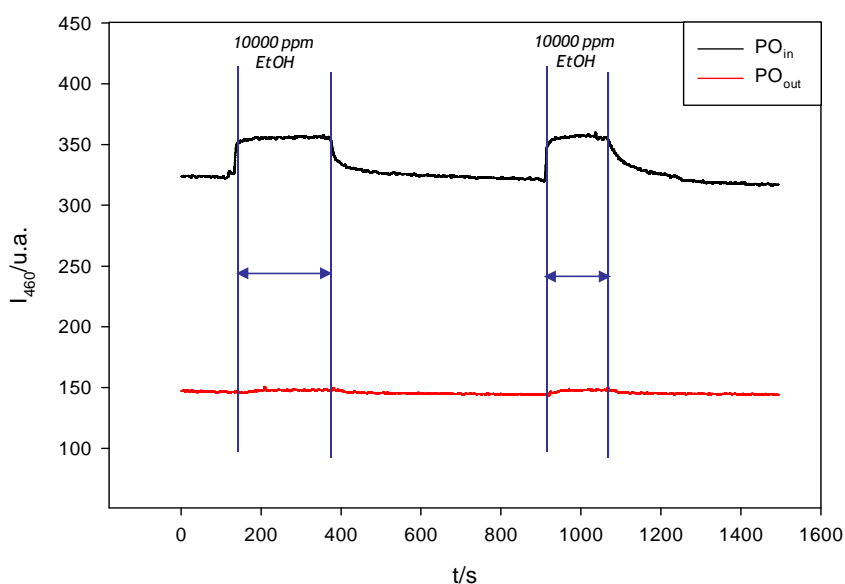


Figura 3.13. Intensità di emissione a 460 nm per la specie PO_{in} (in nero) e quella PO_{out} (in rosso).

Dal confronto dell'andamento dei due segnali, si può notare come, in corrispondenza dell'incremento con 10000 ppm di etanolo del flusso di gas inerte, il cavitando PO_{in} fornisca una risposta, in termini di ΔI_{em} , circa dieci volte superiore rispetto alla specie PO_{out} .

E' però importante sottolineare che l'utilizzo di flussi di gas saturo, sebbene "diluato" con gas inerte, porta con se molte fonti di errore. Per cercare di minimizzare l'errore associato a queste misurazioni sarebbe opportuno servirsi di bombole con concentrazione certificata di analita e sistemi di controllo dei flussi di gas più fini. Sfortunatamente, in commercio sono reperibili per gli analiti di interesse (ovvero gli alcoli con differente catena alchilica) solamente bombole con un range di concentrazione fra i 100 e i 500 ppm. A tali valori di concentrazione, con l'apparato sperimentale a disposizione, il rapporto segnale/rumore non risulta essere dei migliori. Il motivo di ciò è da andare a ricercare nel software di gestione dello spettrofluorimetro su cui sono state condotte le prove, che non permette di scalare l'intensità di emissione per valori al di sopra di 1000 u.a.

Nonostante queste limitazioni, è stato comunque possibile stilare una "scala di preferenza" del sensore nei confronti dei diversi analiti. Sono infatti state condotte prove utilizzando bombole di metanolo, etanolo e propanolo rispettivamente a 516, 500 e 501 ppm. Volendo abbassare ulteriormente la sensibilità, sono state eseguite anche prove su analiti con concentrazione nell'ordine delle 100 ppm. La risposta del sensore a questi differenti analiti è, per entrambi i set di misure, metanolo>etanolo>propanolo. Negli istogrammi di figura 3.14, che derivano da un trattamento statistico relativo a prove su più strati sottili, vengono mostrati i risultati ottenuti.

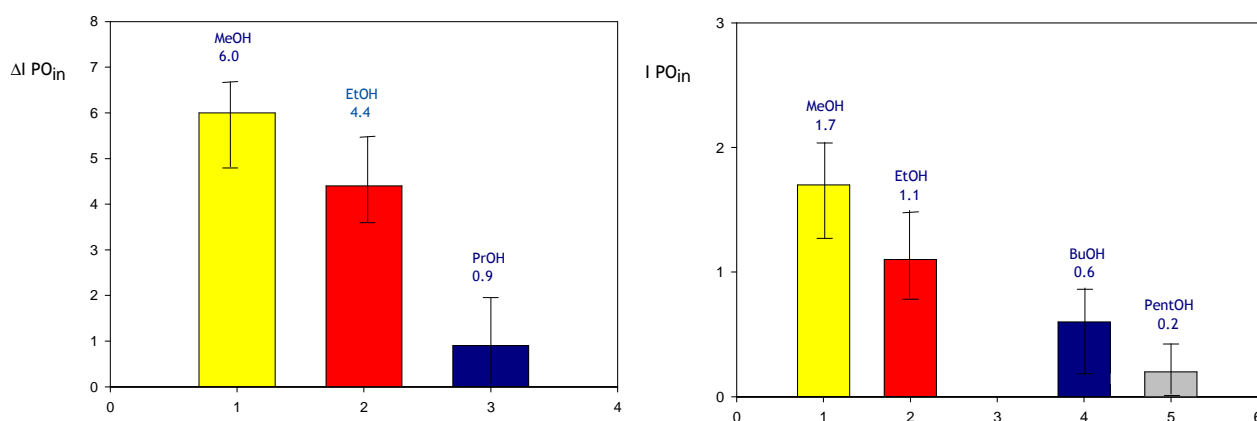


Figura 3.14. risposta del sensore a flussi di analita a concentrazione certificata di 500 ppm (a sinistra) e 100 ppm (a destra).

Prove analoghe sono state effettuate anche su film sottili del cavitando OUT e del composto modello e, per entrambi, la risposta del sensore è assimilabile al rumore di fondo. Questo risultato, ovviamente, si discosta molto da quanto ottenuto in soluzione, ed è un'ulteriore conferma del fatto che la presenza della cavità, all'interfaccia solido-gas, sia fondamentale.

Per meglio comprendere l'importanza di questi risultati, è possibile fare un confronto con un lavoro del 1999⁹, del gruppo di ricerca del professor Dalcanale dell'Università di Parma. In questo lavoro, per molecole molto simili a quelle presentate in questo capitolo viene prospettato un ruolo da sensore chimico per la determinazione di alcoli. Il segnale analiticamente utile che viene preso in considerazione è però relativo alle variazioni di frequenza di vibrazione del piatto di una microbilancia al quarzo, sul quale è stato depositato uno strato sottile della molecola di figura 3.15. Conseguentemente all'inclusione di analita nel film, si hanno delle variazioni nella frequenza di vibrazione, che rappresentano la risposta analitica.

La risposta a flussi di analita dell'ordine dei 3000 ppm (figura 3.15) risulta essere opposta rispetto a quella ricavata per il sensore fluorescente PO_{in} . Questo è dovuto al fatto che, nella tecnica QCM, l'aumento di risposta del sensore è fortemente influenzato da interazioni di natura aspecifica, che non implicano necessariamente la formazione del legame ad idrogeno (e la conseguente interazione π -alifatica con

la superficie interna della cavità) fra analita e recettore. Al contrario, uno dei vantaggi dell'utilizzo della fluorescenza per questo tipo di sistemi sta proprio nell'assenza di interazioni aspecifiche che portano a variazioni dello stato eccitato del luminoforo.

Ovviamente, più l'analita è pesante, più la sua inclusione ha un peso maggiore. Normalizzando la risposta del sensore rispetto a quella del PECH (polyepichlorohydrin), specie che non è in grado di interagire come il cavitando con gli alcoli, il risultato che esprime l'affinità del sensore rispetto agli alcoli è in accordo con quanto ricavato nelle misure di fluorescenza (figura 3.16).

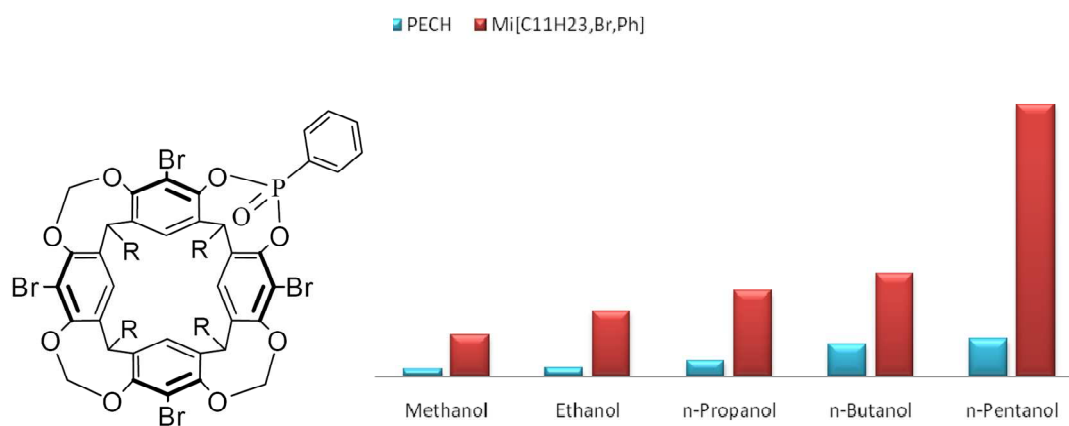


Figura 3.15 Istogramma delle risposte QCM del cavitando (a sinistra, barra rossa) e PECH (barra azzurra) a flussi di alcoli a 3000 ppm.

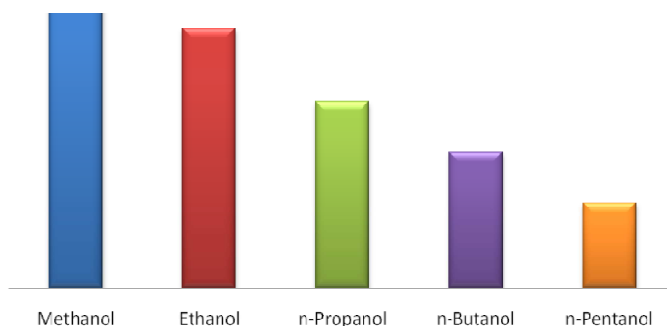


Figura 3.16. Risposte QCM del sensore normalizzate rispetto alla risposta del PECH.

Determinazioni cristallografiche hanno mostrato che la selettività per sistemi come il PO_{in} (che dipende dall'effetto sinergico di due forze: il legame ad idrogeno del gruppo $\text{P}=\text{O}$ e l'interazione π -alifatica) è massima per gli alcoli con catene da C1 a C4, e cala drasticamente dal C5 in poi.

3.6 Prospettive future.

Per aumentare ancora di più la sensibilità e ottenere una risposta solo per MeOH ed EtOH, è in programma la sintesi di un nuovo cavitando in cui l'accessibilità alla cavità è ancora più controllata, grazie alla sostituzione dei tre ponti metilenici della molecola PO_{in} , con 3 ponti $\text{P}=\text{S}$ (figura 3.17). Studi di modellistica molecolare hanno mostrato come la cavità in questo caso diventi accessibile solo a funzioni alcoliche legate a catene alchiliche di non più di 2 atomi di carbonio. Per catene superiori non si riesce ad avere la sinergia fra la forza del legame ad idrogeno e l'interazione π -alifatica, che è alla base del riconoscimento dell'analita.

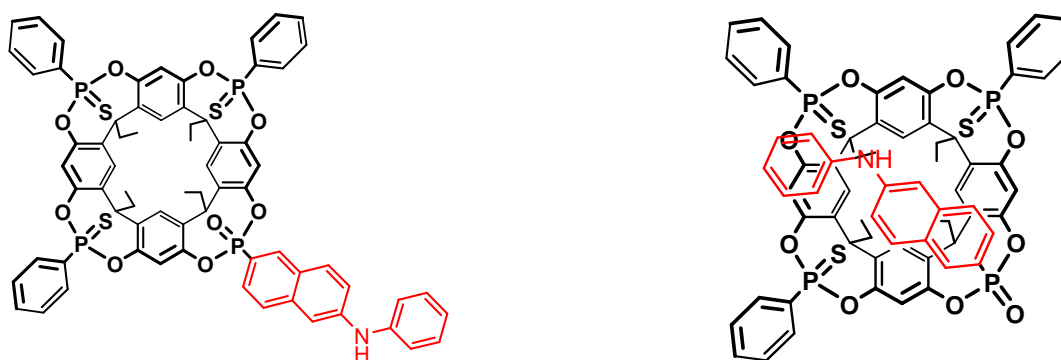


Figura 3.17. I due isomeri con i tre ponti $\text{P}=\text{S}$.

3.7 Bibliografia

1. L. Prodi; *New J. Chem.* **2005**, 29, 20-31; J.R. Lakowicz *Principles of Fluorescence Spectroscopy* **1999**, Kluwer, NY.
2. L. Fabbrizzi; *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 205, 1-2.
3. L. Fabbrizzi; A. Poggi, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 197.
4. O.S. Wolfbeis; *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, volumi I-II, CRC press, Boca Raton, FL, **1991**.
5. B. Valeur, I. Leary; *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 205, 3-40.
6. H-G. Lohr, F. Vogtle; *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 65.
7. B.C. Gibb, R.G. Chapman, J.C. Sherman; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1505-1509.
8. P. Delangle, J.-C. Mulatier, B. Tinant, J.-P. Dutasta *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3695-3704.
9. R. Pinalli, F.F. Nachtugall, F. Ugozzoli, E. Dalcanale *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2377-2380.

CAPITOLO 4

NANOPARTICELLE DI ORO

4.1 Introduzione

Fra le varie tipologie di nanoparticelle, quelle di oro sono, per molte ragioni, quelle su cui si è incentrato il maggior numero di studi. Innanzitutto occorre premettere che la loro sintesi è molto semplice, visto che con molti reagenti disponibili in commercio è possibile portare a termine la reazione di riduzione dell' Au(III) ad Au^0 ; oltre a questo, l'oro è il metallo le cui soluzioni colloidali sono più stabili e presentano proprietà (elettroniche, magnetiche ed ottiche) molto peculiari, riconducibili alla loro dimensione e dovute al cosiddetto “*quantum size effect*”, che verrà trattato più avanti nel corso di questo capitolo.

Sin dall'antichità, si ricorreva alle proprietà cromatiche delle nanoparticelle di oro per decorare vetri e ceramiche, in modo da conferire agli oggetti particolari effetti di iridescenza che li rendevano pregiati. Le soluzioni colloidali di oro sono comunque ben conosciute ed utilizzate da molti secoli anche nei trattamenti medici per molti tipi di patologie (stati di instabilità mentale, artriti, circolazione sanguigna, tubercolosi, ecc.)¹ e in test medici². A dispetto di questo utilizzo che risale a molto indietro nel tempo, i primi tentativi scientifici di fornire una spiegazione delle particolari proprietà chimiche collegate all'oro colloidale risalgono al 1718 quando Hans Heinrich Helcher pubblicò un trattato completo su questo tema³, e nel 1857, dopo oltre un secolo, quando Faraday descrisse la sintesi delle nanoparticelle di oro per mezzo della riduzione di un sale in soluzione acquosa, e cercò di spiegarne le relative proprietà ottiche⁴.

Negli ultimi decenni, sono stati proposti molti metodi (sia chimici che fisici) per la preparazione di soluzioni colloidali di oro e di argento, fino a che, nel 1994, i professori M. Brust e D.J. Schiffrin⁵, scoprirono una strategia sintetica che, per l'estrema facilità, efficienza e controllabilità che la accompagna, permise grossi passi avanti in questo campo. Questo netto e deciso miglioramento nella ricerca rese possibile la pubblicazione di molti libri⁶, reviews⁷ e un ingente numero di articoli scientifici (più di 100000 negli ultimi 3 anni).

Il motivo di un così crescente interesse scientifico può essere attribuito alle particolari proprietà di questi materiali, che sono indotte dal cosiddetto “*quantum size effect*”.

Normalmente, le proprietà dei metalli e dei semiconduttori vengono descritte facendo riferimento agli elettroni che si trovano ad occupare differenti bande di energia, mentre per i singoli atomi vengono studiati livelli discreti di energia in cui gli elettroni si trovano. Quando però si hanno aggregati di pochi atomi che vanno a costituire piccoli clusters con dimensioni nel range dei nanometri, dal punto di vista elettronico la situazione risulta essere intermedia fra l'atomo e il metallo *bulk*. Le proprietà (elettroniche, ottiche, elettrochimiche, magnetiche e catalitiche) delle nanoparticelle differiscono così da quelle dei materiali *bulk*, a causa della diversa distribuzione di energia che compete agli elettroni di valenza. Vi è quindi una forte dipendenza delle proprietà elettroniche dalle dimensioni: questa relazione può essere spiegata solamente se si fa riferimento alle regole della quanto-meccanica. Si parla quindi di “*quantum size effect*” e i colloidi metallici vengono chiamati “*quantum dots*”.

L'evidenza maggiore del “*quantum size effect*”, e delle nuove proprietà che insorgono come sua conseguenza, è data dal colore caratteristico delle nanoparticelle metalliche. Esso trae origine dalla cosiddetta “*plasmon resonance band*”, una banda di assorbimento tipica per i colloidi metallici che deriva dall'oscillazione collettiva degli elettroni sulla superficie delle nanoparticelle. Nel caso dei cluster di oro essa mostra un massimo nella regione spettrale fra i 500 e 600 nm, conferendo un colore che varia fra il rosso rubino e il blu/marrone e che

dipende dalla dimensione, dalla forma e dalla polarità dell'ambiente. La “*plasmon resonance band*” è interpretabile attraverso la teoria Mie⁸, ed è stata studiata da molti autori.

Per nanoparticelle particolarmente piccole e in determinate condizioni di polarità dell'ambiente, il gap energetico associato alla “*Plasmon resonance band*” può dar luogo ad una vera e propria luminescenza.

Dal punto di vista elettrochimico, esperimenti di CV e DPV condotti su dispersioni omogenee di nanoparticelle di oro e argento stabilizzate alla superficie da unità alcantioliche hanno fornito risultati molto interessanti in quanto è stato possibile individuare per questi sistemi 15 differenti stati redox accessibili^{9,10}, il che significa che è possibile osservare singole transizioni elettroniche, permettendo la descrizione del sistema attraverso il cosiddetto effetto di *Coulomb-blockade*, che afferma che si possono avere queste transizioni se l'energia associata ($E_c = e^2/2C$) è maggiore dell'energia termica ($E_T = k_b T$, dove k_b è la costante di Boltzmann)¹¹. Queste osservazioni sono state effettuate utilizzando la tecnica STM, in cui viene monitorato l'*electron tunnelling* fra l'estremità della punta e le nanoparticelle¹².

Tutte le proprietà delle nanoparticelle finora descritte, sono state osservate e ben comprese negli studi del Prof. G. Schmid, in particolare l'indagine è stata condotta su clusters di oro composti da 55 atomi, Au₅₅, stabilizzati alla superficie con dei leganti a base di fosfine¹³.

Nonostante la ricerca in questo campo, che risulta essere molto vasto, stia facendo enormi passi avanti, non si è ancora indagato in maniera approfondita sulle proprietà fotofisiche e fotochimiche che insorgono quando la superficie delle nanoparticelle viene funzionalizzata con unità cromoforiche. Questi sistemi, costituiti da un *core* metallico e da un “guscio” organico, potrebbero risultare molto interessanti nell'ottica del design di apparati fotoattivi, con possibili applicazioni in molti campi (sensoristica, rilascio controllato di farmaci, catalisi ecc.). La ragione di questo apparentemente minore interesse è da ricercare nel fatto che, in generale, le nanoparticelle metalliche hanno la caratteristica di spegnere gli stati eccitati dei fluorofori attraverso processi di trasferimento di

energia o di elettrone. In questo capitolo, verranno invece mostrati casi in cui questo non è l'unico processo osservabile.

4.2 Sintesi delle nanoparticelle di oro.

Nella parte introduttiva di questo capitolo, è stato detto che esistono molte strategie, sia fisiche che chimiche, percorribili per la sintesi di nanoparticelle metalliche⁷. Ciò che verrà di seguito illustrato riguarda essenzialmente le metodiche in cui le nanoparticelle vengono sintetizzate per mezzo della stabilizzazione della loro superficie con unità cromoforiche.

E' ben risaputo che le specie chimiche che posseggono determinate funzionalità (fra queste si ricordano tioli, tioeteri e tioesteri, disolfuri, isocianati e anche fosfine, ammine e carbossilati) mostrano tendenza a formare legami stabili con le superfici di oro. Questa affinità è presente, benché minore, nei confronti della superficie di nanoparticelle di oro, e porta ad una maggiore stabilità dei colloidi, in quanto la passivazione della superficie ne previene l'aggregazione. Ovviamente gli agenti stabilizzanti sopra elencati non posseggono tutti la stessa affinità per l'oro, quindi è utile sottolineare che le nanoparticelle più stabili sono quelle la cui superficie viene derivatizzata con tioli alchilici, e fra questi la maggiore stabilizzazione viene offerta da quelli le cui catene alifatiche sono comprese fra C_6 e C_{18} .

Come è già stato detto in precedenza, il primo metodo chimico per la sintesi di oro colloidale è quello riportato da Faraday, mentre attualmente la riduzione del sale d'oro necessaria per ottenere le nanoparticelle viene condotta in modi diversi. Fra tutti si ricorda il metodo di Turkevich del 1951¹⁷, che ha come risultato netto la formazione di nanoparticelle di oro stabilizzate con citrato, con un diametro di circa 20 nm e con una superficie carica negativamente che le rende solubili in acqua. Il legame oro-citrato però, non risulta particolarmente forte, quindi le particelle che si ottengono con il metodo Turkevich sono caratterizzate da una bassa stabilità, che porta a un loro collasso nell'arco di poco tempo.

Una sintesi che porta a risultati decisamente migliori in termini di stabilità è quella proposta dai Professori M. Brust e D. J. Schiffrin nel 1994⁵ e che rappresenta, come già accennato precedentemente, la strategia sintetica più affidabile e più utilizzata.

Essa prevede la riduzione dell'oro a partire da un complesso di Au^{III} solubile in acqua (AuCl_4^- , reperibile in commercio sotto forma di acido tetracloro aurico HAuCl_4). Lo ione complesso viene successivamente trasferito in una fase organica (tipicamente toluene) mediante un tensioattivo (il tetraottil ammonio bromuro). Nella fase organica è presente nelle giuste proporzioni l'agente stabilizzante (un tiolo alifatico). La riduzione di Au^{III} ad Au^0 (e contemporaneamente la stabilizzazione della superficie delle nanoparticelle con il tiolo) avviene all'interfaccia fra la fase acquosa e quella organica per mezzo dell'aggiunta di NaBH_4 . Nella figura 4.1 è riportato lo schema che descrive questa procedura di sintesi.

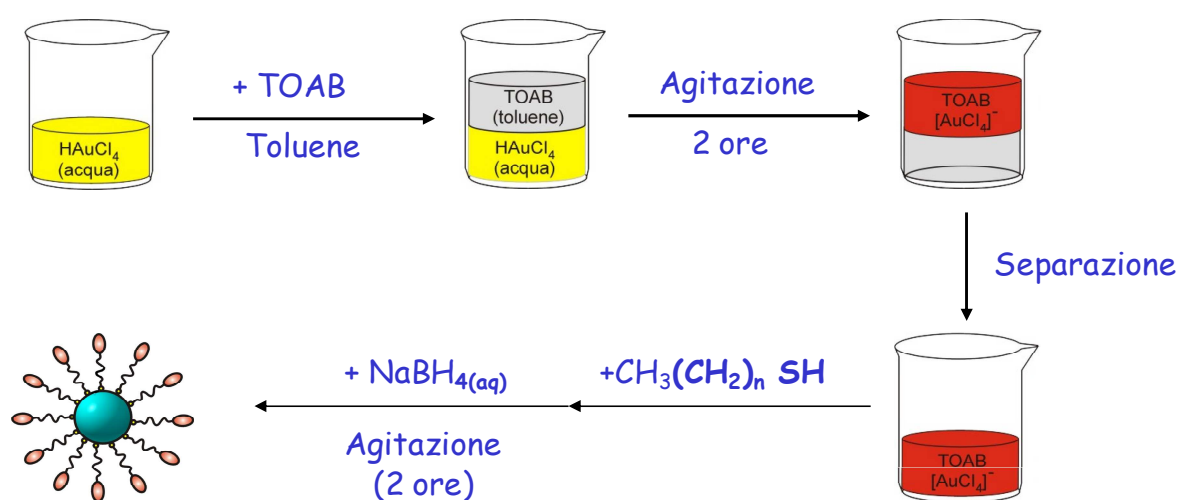


Figura 4.1. Sintesi di nanoparticelle di Au stabilizzate da un tiolo alifatico

Adottando questa procedura estremamente semplice, si ottiene una dispersione di nanoparticelle di oro (con una distribuzione del diametro medio che dipende dalle condizioni sperimentali¹⁶) dotate di una buona stabilità, tanto che è possibile

considerarle come un comune prodotto chimico (è possibile evaporare il solvente, conservarle e successivamente risolubilizzarle). Con la medesima strategia è possibile variare l'agente stabilizzante (introducendo funzionalità differenti dal tiolo come l'etere, il tioestere, l'ammina e l'isocianato), per ottenere nanoparticelle diversamente funzionalizzate.

Una ulteriore variante consiste invece nella preparazione preliminare di nanoparticelle "nude", ovvero con una superficie debolmente stabilizzata da forze di natura elettrostatica (il tetraottil ammonio bromuro già presente nell'ambiente di sintesi possiede le caratteristiche giuste) e la successiva passivazione con leganti più forti¹⁸ (figura 4.2)

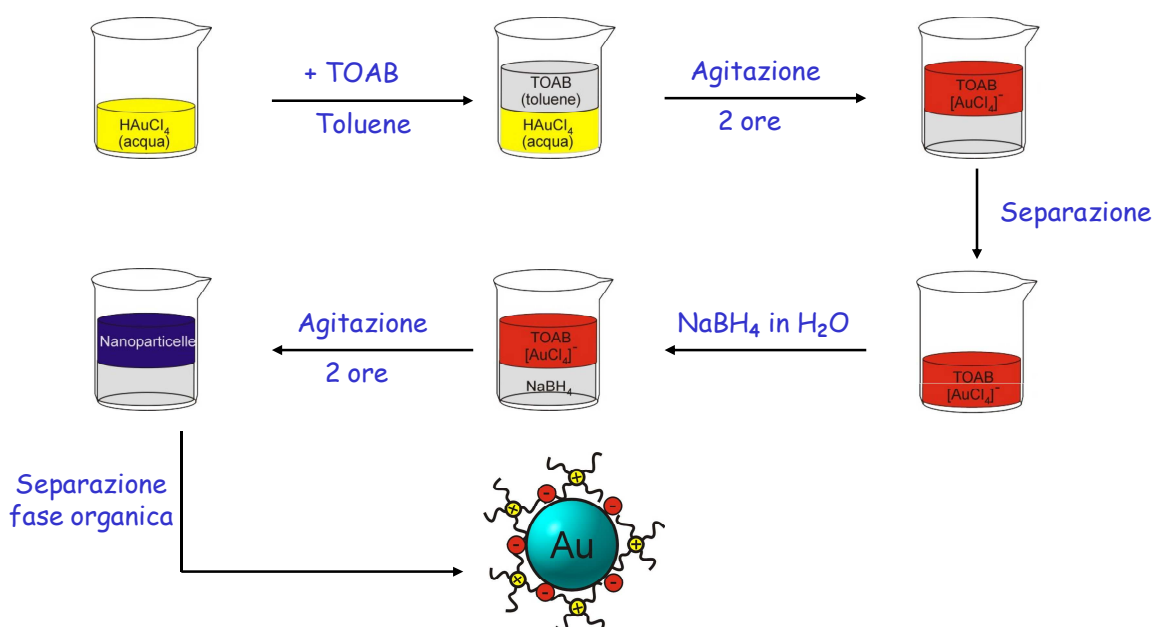


Figura 4.2. Sintesi di nanoparticelle di Au debolmente stabilizzate da forze elettrostatiche.

4.3 Interazione fra cromoforo e nanoparticella

Il primo passo da fare è quello di dimostrare che la superficie di oro e la molecola stabilizzante siano effettivamente legate. Esistono molte vie per dimostrarlo, una di queste prende in considerazione i traccianti NMR della specie che si suppone

interagisca con il cluster metallico. L'eventuale formazione di un legame con la superficie di oro ha infatti come conseguenza la modificazione della distribuzione elettronica nelle molecole adsorbite, e questo è evidenziato da picchi NMR più larghi e differenti chemical shift¹⁸ (nel caso di leganti con la funzione tiolica si ha anche la scomparsa del segnale SH, come previsto dalla formazione del legame R-CH₂-S-Au¹⁹).

In questo capitolo si farà invece riferimento a lavori in cui l'evidenza dell'effettiva formazione del legame fra oro e agente passivante è data da esperimenti con tecniche spettroscopiche nel range dell'UV-Visibile (assorbimento ed emissione di luce). Siccome la localizzazione della "*plasmon resonance band*" (PRB) è dovuta agli elettroni che si trovano sulla superficie della nanoparticella, è evidente che la formazione di legami chimici con altre specie ne perturbi le proprietà (si ricorda però che la PRB dipende anche dal tipo di materiale, dalle dimensioni e dalla forma del *core* metallico, oltre che dal solvente in cui la dispersione è solubilizzata)²⁰.

Risulta perciò chiaro che lo spostamento della PRB (rispetto alla sua originale posizione per nanoparticelle debolmente stabilizzate per via elettrostatica) è tanto più significativo quanto più è forte l'interazione con l'agente stabilizzante: per questo è stato possibile stabilire anche con la spettrofotometria che i leganti a base di tiolo sono quelli in grado di legarsi con maggiore efficienza alla superficie, in quanto per essi è stato osservato il massimo shift della PRB.

Quando l'agente stabilizzante possiede proprietà luminescenti, è possibile, utilizzando tecniche spettrofluorimetriche, ricavare informazioni molto interessanti riguardo l'interazione con la superficie metallica. Per la specie chimica legata diventano così accessibili nuove vie di disattivazione dello stato eccitato, come ad esempio l'energy o l'electron transfer, e diventano possibili fenomeni che portano a variazioni nelle velocità dei processi di decadimento (radiativo e non radiativo)⁴⁸.

Il primo esempio di funzionalizzazione covalente della superficie di nanoparticelle con unità cromoforiche fu pubblicato nel 1997²¹, ma i primi studi dal punto di vista spettroscopico per sistemi di questo genere risalgono ai lavori del Professor Murray²², che facendo reagire la 5-aminoacetamido-fluoresceina riuscì a

derivatizzare la superficie di nanoparticelle di oro ricoperta da uno strato protettivo di tiopronina, ottenendo delle particelle con un numero medio di fluorofori ancorati alla superficie di circa 3.7 unità.

Per questo sistema, lo studio spettroscopico servì a rivelare che la luminescenza della fluoresceina era stata notevolmente spenta dall'interazione con il cluster metallico, pur mantenendo la banda di emissione le stesse caratteristiche di energia e forma rispetto al legante libero. Il dubbio che lo spegnimento della fluoresceina fosse dovuto ad effetti di *self-quenching* (possibili per cromofori di quel genere, caratterizzati da bassi *Stoke-shift*) fu risolto attraverso un esperimento di confronto che permise di stabilire che alle concentrazioni alle quali era stata effettuata la sintesi non sussistevano tali fenomeni. Questa fu quindi la prima evidenza spettroscopica dell'effetto di spegnimento della luminescenza esercitato dalla superficie metallica delle nanoparticelle su un cromoforo covalentemente legato attraverso un'unità tiolo. Dopo questo studio, seguirono molti altri lavori in cui l'indagine su tale effetto fu portata avanti, utilizzando diverse specie come cromoforo, ovvero il dansile, lo stilbene, le porfirine, i fullereni, il pirene e le cianine.

4.4 Il pirene e le nanoparticelle di oro.

Il pirene è senza ombra di dubbio la specie che ha attratto su di sé il maggiore interesse da questo punto di vista, in quanto fra le sue proprietà esiste la possibilità di formare eccimeri dotati di una banda di luminescenza notevolmente diversa dal monomero, che può essere osservata solamente quando due unità si trovano in stretto contatto. Questa condizione può verificarsi, ad esempio, quando molecole di pirene opportunamente derivatizzate sono legate alla superficie delle nanoparticelle. E' stato dimostrato che il più importante percorso di disattivazione della luminescenza in questi casi è dovuto all'*electron transfer* fra pirene eccitato e oro²³. La manifestazione evidente di questo proviene dagli studi che, negli ultimi anni, i professori P.V. Kamat e K.G. Thomas hanno portato avanti sull'interazione

fra il pirene e le nanoparticelle di oro utilizzando diversi leganti. Ciò che è emerso da studi sull'assorbimento del transiente, conseguentemente all'eccitazione pulsata con una sorgente laser, è che si ha inizialmente la formazione del pirene radical-catione a causa del trasferimento di un elettrone fra la specie eccitata e il *core* di oro della nanoparticella a cui il pirene è legato. Il successivo processo di back-electron transfer fa sì che il sistema torni allo stato fondamentale: è importante ricordare che la separazione di carica può durare per tempi nell'ordine dei microsecondi.

4.5 Influenza della distanza e del legante su sistemi di nanoparticelle di oro derivatizzate con unità pireniche.

Durante questo periodo di dottorato ha avuto un ruolo molto importante lo studio di sistemi di nanoparticelle derivatizzate alla superficie da unità di pirene diversamente legate. In questo paragrafo verranno perciò illustrati i risultati ottenuti per due diversi tipi di leganti, il tiolo e l'ammina.

Per queste due classi di gruppi funzionali, sono stati condotti studi in parallelo per dimostrare quali fossero i punti in comune e quali le differenze in relazione alla variazione delle proprietà spettroscopiche del pirene.

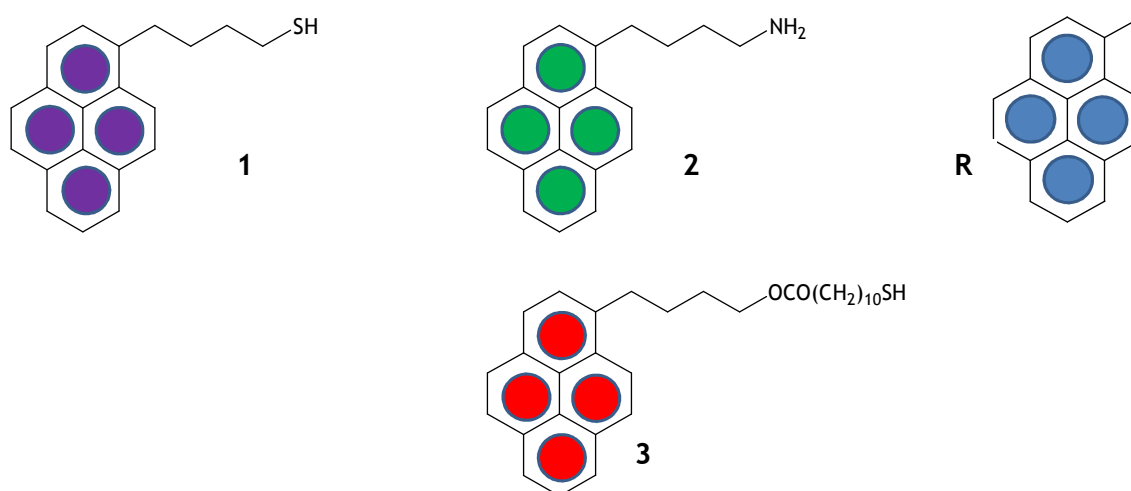


Figura 4.3. I tre derivati del pirene studiati: due con catena alchilica corta (un tiolo, 1, ed un'ammina, 2) ed uno a catena lunga (3). Il composto R è stato utilizzato come riferimento.

L'integrazione di molecole dotate di proprietà fotofisiche ben note e conosciute come i composti 1, 2 e 3 con sistemi di nanoparticelle di oro caratterizzate a loro volta da proprietà molto particolari, è stato quindi il punto focale di questa ricerca, che ha come finalità ultima quella di ottenere il controllo e il miglioramento delle caratteristiche di una vasta gamma di molecole. L'obiettivo è quindi quello di comprendere la natura dell'interazione fra le nanoparticelle e il pirene in funzione di parametri quali la natura del legante e la distanza dalla superficie di oro, per creare i presupposti per il design di materiali con nuove ed interessanti funzionalità determinate dalla presenza di un *core* metallico.

In letteratura, esistono molti lavori in cui vengono modulate le proprietà luminescenti di un cromoforo per effetto dell'interazione con cluster di oro²⁴⁻⁴³, ed è stato dimostrato come la fluorescenza possa essere spenta attraverso meccanismi di electron o energy transfer. Per quanto riguarda i processi di energy transfer, le cui costanti di velocità sono dipendenti dalla distanza fra lo spegnitore e il cromoforo, esiste una teoria, NSET (nanosurface energy transfer theory)³⁴⁻³⁶, che prevede una proporzionalità con l'inverso della quarta potenza della distanza, r^{-4} , che ben descrive questi meccanismi in particolare per nanoparticelle molto piccole, con un diametro medio dell'ordine di 1,5 nm. In queste condizioni infatti, i cluster non presentano bande di risonanza plasmonica coerenti, e mostrano elevate costanti di spegnimento della fluorescenza di cromofori ad esse legati^{29,34-36}. Nanoparticelle più grandi invece, con un diametro dell'ordine degli 80 nm, hanno la capacità di creare un forte campo elettrico nelle loro vicinanze, che ha come effetto quello di aumentare l'efficienza di eccitazione del cromoforo e conseguentemente la costante di disattivazione radiativa. Questi fenomeni, dipendenti dalle dimensioni del core metallico, e dalla distanza da questo dei cromofori, non sono osservabili esclusivamente per nanoparticelle di oro, ma anche per clusters di argento³⁷⁻⁴³. Il passaggio da effetto di *quenching* ad aumento della velocità dei processi di disattivazione radiativa è stato preso in esame in una pubblicazione del gruppo di ricerca del Professor Novotny, in cui è stata stabilita una sorta di continuità fra questi due fenomeni in funzione della dimensione dei

cluster e della distanza cromoforo-core metallico⁴⁷. E' però importante sottolineare come queste osservazioni non siano estendibili a tutte le classi di fluorofori, come ad esempio le cianine⁴².

Risulta molto interessante ai fini di quanto verrà mostrato in seguito illustrare brevemente i risultati di due lavori dei Professori Thomas e Kamat^{44,46} su nanoparticelle di oro con diametro medio fra i 5 e gli 8 nm, stabilizzate alla superficie dal composto **5** di figura 4.4 (si noti la catena alchilica corta e quindi distanza cromoforo-nanoparticella molto ridotta) e il composto **6** di figura 4.4 (catena alchilica più lunga).

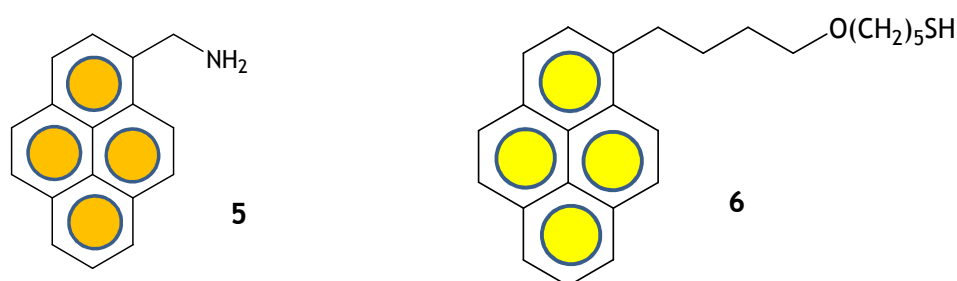


Figura 4.4. Amminopirene a catena corta (**5**) e pirenetiolo a catena lunga (**6**)

Per le nanoparticelle stabilizzate con **5**, non è stato riscontrato alcun effetto di spegnimento della luminescenza attribuibile a fenomeni di electron/energy transfer, mentre per le particelle derivatizzate con **6**, il meccanismo che governa il drastico calo di luminescenza del pirene riscontrato è quello dell'electron transfer fra il pirene eccitato e la superficie di oro, affermazione che trova riscontro nel completo recupero della fluorescenza osservato quando l'elettrodo assume certi potenziali (electrochemical bias), tali da prevenire il processo di trasferimento elettronico. Tutto questo però pare in contrasto con quanto asserito precedentemente, in quanto nel caso del composto **5** il pirene si trova più vicino alla superficie di oro rispetto al composto **6**, e questa anomalia è stata attribuita da parte degli autori alla differente natura del legante. Nel caso dell'ammina infatti, gli autori hanno attribuito questo fenomeno alla presenza dell'azoto che è

in grado di indurre una polarizzazione del core di oro, e per questo rendersi responsabile del non verificarsi del processo di electron transfer. Viene quindi da se che, con queste premesse, non sia possibile poter chiarire definitivamente la dipendenza dalla distanza cromoforo-particella nell'occorrere dei processi di spegnimento o innalzamento della fluorescenza.

Il preliminare intento del lavoro che verrà presentato è quindi quello di studiare le proprietà fotofisiche di nanoparticelle di oro stabilizzate alla superficie da due derivati del pirene strutturalmente simili (composti **1** e **2**), ma caratterizzati da funzionalità terminali differenti, un tiolo ed un'ammina. La catena alchilica che separa il pirene dalla funzione che andrà poi a legarsi con la superficie di oro in entrambi i casi è a 4 atomi di carbonio, ovvero sufficientemente lunga per evitare processi di spegnimento della fluorescenza del pirene via electron transfer con il doppietto dell'azoto (fenomeno che lo zolfo non è in grado di dare e che sarebbe fonte di differenziazione fra i due composti), ma anche sufficientemente corta per rientrare nella casistica delle interazioni con le nanoparticelle cosiddette "*short-range*". I risultati di questo studio preliminare verranno poi confrontati con quanto osservato per il composto **3**, caratterizzato da una più elevata separazione fra cromoforo e metallo.^{47,48}

Per quanto riguarda i composti **1** e **2** liberi in soluzione, i parametri fotofisici sono pressoché simili a quelli del composto di riferimento scelto, ovvero 1-methylpirene (**R**), che per l'assenza di opportuni gruppi funzionali al termine della catena non ha la possibilità di legarsi alle nanoparticelle. Gli spettri di assorbimento quindi presentano per tutti e tre i composti la classica struttura vibrazionale del pirene con un massimo a 343 nm a cui compete un coefficiente di assorbimento molare $\epsilon = 40000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In soluzione areata di THF, i tempi di vita dello stato di singoletto responsabile dell'emissione, misurati con la tecnica del fotone singolo, sono di 16 ns. Questa similitudine fra composti **1** e **2** e il riferimento è completata dalla perfetta sovrapposizione degli spettri di emissione e dall'identico rendimento quantico ($\Phi = 0.071$) che sta ad indicare che sia gli stati fondamentali che gli stati eccitati delle tre molecole sono identici. Tutto questo è una conferma anche della

totale assenza di interazioni fra il pirene e la funzione terminale, che nel caso del composto **2** (a differenza del composto **1**) potrebbe dar luogo, come accennato in precedenza, ad electron transfer dal doppietto dell'azoto al pirene eccitato. Una ulteriore conferma di questo è fornita anche dall'assenza di variazioni nell'emissione del pirene conseguentemente alla titolazione del composto **2** con acido triflico.

Detto questo, se si prendono in considerazione soluzioni dei composti **1**, **2** ed **R** alla stessa concentrazione, le variazioni dei parametri fotofisici del pirene che potrebbero osservarsi dopo l'aggiunta della medesima quantità di nanoparticelle di oro "nude" (ovvero prodotte mediante la sintesi descritta nel paragrafo precedente) sarebbero necessariamente dovute alla diversa natura del legante. Se si osservano le figure 4.5 e 4.6, in cui sono riportati gli spettri di assorbimento, emissione ed eccitazione di due soluzioni dei composti **1** e **2** (in cui $[\text{pirene}] = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$) prima e dopo l'aggiunta della stessa aliquota di nanoparticelle di oro, si osserverà per entrambi un comportamento analogo, che sta ad indicare che la natura del gruppo legante non influisce sulle proprietà del pirene legato al core metallico.

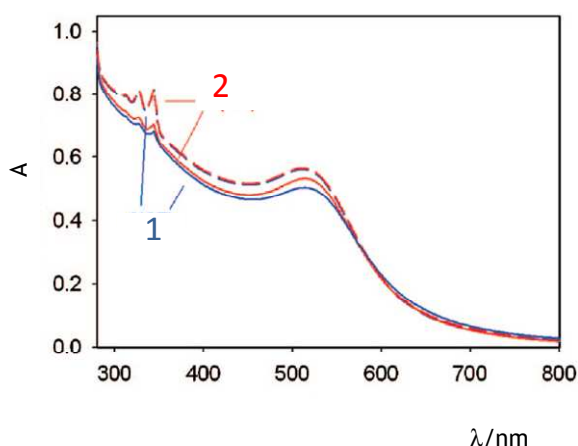


Figura 4.5. Spettri di assorbimento dei composti **1** e **2** prima (tratto continuo) e dopo (tratteggiato) l'instaurarsi dell'interazione con le nanoparticelle di oro.

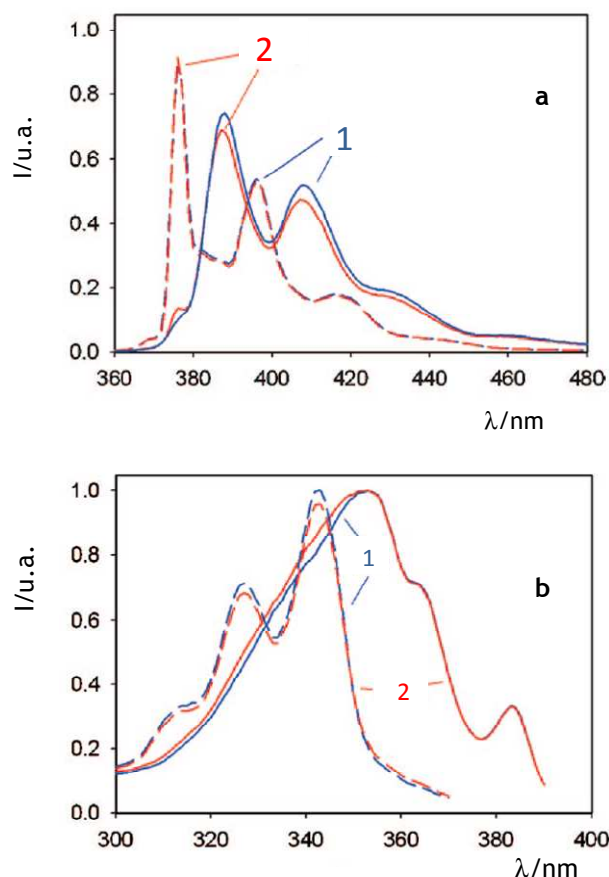


Figura 4.6. Spettri di emissione (a) ed eccitazione (b) dei composti **1** e **2**, prima (tratto continuo) e dopo (tratteggiato) l'instaurarsi dell'interazione con le nanoparticelle di oro.

N.B. E' stata applicata la correzione degli spettri^{50,51}, necessaria a causa dell'effetto di filtro sull'emissione del pirene da parte delle nanoparticelle di oro.

Nel caso del riferimento **R** invece, non si hanno sostanziali variazioni fra gli spettri di assorbimento, emissione ed eccitazione registrati prima e dopo l'aggiunta di nanoparticelle di oro.

Analizzando nel dettaglio gli spettri di figura 4.5, è possibile osservare forti perturbazioni nella banda di assorbimento strutturata del pirene, oltre che nella PRB delle nanoparticelle di oro. Attraverso la deconvoluzione dello spettro di assorbimento del pirene è stato possibile perciò stimare per esso un calo del coefficiente molare di assorbimento pari a circa il 30%, rispetto a quanto osservato in assenza dei cluster metallici di oro. Dal punto di vista della fluorescenza, successivamente alla formazione del legame fra i composti **1** e **2** e l'oro, si assiste ad un consistente red-shift dello spettro di emissione, accompagnato da un sostanziale cambiamento della struttura della banda, come è possibile notare dalla figura 4.6A. Queste variazioni nell'ambito della fluorescenza sono, come osservato per sistemi analoghi⁵⁸, una prova della forte interazione fra pirene ed oro.

Il rendimento quantico di emissione aumenta di 1.4 volte per il composto **1** e di 1.5 volte per il composto **2**, e contemporaneamente a questo si assiste ad un accorciamento del tempo di vita dello stato eccitato (dai 16 ns dei fluorofori liberi si passa rispettivamente a 6.2 e 5.7 ns). Questo comportamento non è nuovo per fluorofori che si trovano in prossimità di una superficie metallica nanostrutturata, ed è dovuto ad un aumento della costante radiativa dello stato eccitato fluorescente. Questi risultati sono sorprendenti qualora vengano confrontati con quelli ottenuti per il composto **3**, caratterizzato da una lunga catena che separa il pirene dalla superficie di oro. E' infatti la presenza di una catena più lunga che fa sì che si abbia un forte spegnimento della fluorescenza (circa del 90% rispetto al composto **3** libero in soluzione), un leggero blue-shift della banda di emissione ed un consistente accorciamento del tempo di vita dello stato eccitato ($\tau = 0.5$ ns).

Per poter fornire una spiegazione più completa riguardo il fenomeno di spegnimento della luminescenza in funzione della lunghezza della catena alchilica che porta il fluoroforo, sono stati condotti studi su modelli computazionali in collaborazione con il gruppo del professor Zerbetto. Sono state prese in considerazione e minimizzate configurazioni in cui 25 unità di pirene erano legate ad una superficie di Au (111) per mezzo di due catene di differente lunghezza (C4 e C11, figura 4.7). Una volta ottimizzate le geometrie, per la catena corta è stato trovato un angolo di tilt (rispetto a quello normale sulla superficie di metallo) di $\sim 20^\circ$. Questo valore risulta essere all'incirca la metà di quello calcolato per le catene più lunghe e flessibili, per le quali è stato stimato un angolo di $45-48^\circ$. L'origine di questo effetto è da ricercare nel fatto che, quando le catene sono corte, l'interazione dominante che governa l'impaccamento dello strato superficiale sull'oro è quella che si instaura fra le unità pireniche, mentre la possibile interazione catena-catena è minima in quanto esse sono troppo corte. In queste condizioni le molecole si riarrangiano in modo da massimizzare le interazioni pirene-pirene. Quando invece si hanno catene alchiliche più lunghe le interazioni fra queste aumentano e le molecole riarrangiano in maniera differente, in accordo con il cambiamento di condizioni.

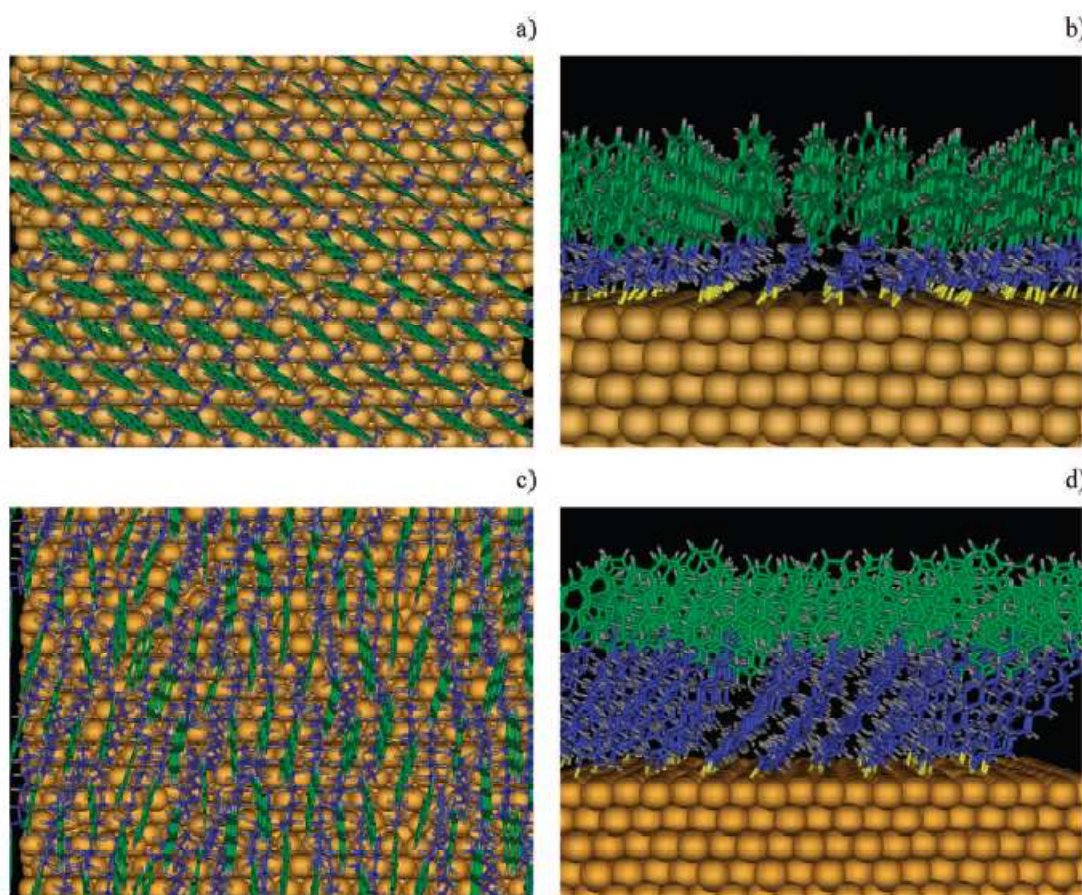


Figura 4.7. Viste dall'alto e laterali dei monostrati di pirene ottimizzati: (a,b) la catena corta C4; (c,d) la catena lunga C11. Le catene sono in blu, il pirene in verde.

La differenza nell'angolo di tilt riscontrata per i due tipi di catene ha un'importante conseguenza: per le catene C4, il pirene si trova quasi perpendicolare alla superficie, mentre per il C11 il fluoroforo è orientato in maniera quasi parallela alla superficie stessa. Le interazioni elettroniche fra il core di oro e lo strato di pirene sono quindi notevolmente influenzate dalla geometria dei due sistemi, e si possono distinguere in due tipi: la prima interazione è quella che ha luogo attraverso la sovrapposizione delle funzioni d'onda dei due frammenti, la seconda invece è influenzata dalle perturbazioni, come ad esempio dal campo elettrico. Un esempio della prima classe è quello relativo al trasferimento di carica fra il metallo e il pirene, la cui probabilità di avvenire è

proporzionale alla sovrapposizione delle nuvole elettroniche. Un esempio della seconda classe è invece l'effetto del campo elettrico generato dal metallo sugli stati elettronici del pirene.

Il fatto che il pirene sia “appiattito” sulla superficie di oro (caso della catena C11) aumenta la probabilità che abbia luogo il trasferimento di carica, che invece sarebbe pari a zero per un'orientazione perpendicolare del fluoroforo. D'altra parte, la minore distanza fra il pirene e gli atomi d'oro (caso del C4), perturba gli stati elettronici simmetricamente permessi, attraverso $E^{\rightarrow} \cdot \vec{\mu}$, dove $\vec{\mu}$ è il momento di transizione fra gli stati perturbati ed E^{\rightarrow} è il campo elettrico generato dal core di metallo. In altri sistemi, è stato trovato che il campo elettrico generato dall'oro può essere consistente e di valore 7 MV/cm.

Oltre a questo, risulta interessante indagare ulteriormente riguardo il ruolo del trasferimento di carica nei sistemi a catena corta e lunga. Non è possibile condurre calcoli quantistici sui sistemi di figura 4.7 a causa delle loro dimensioni, così per ottenere un dato qualitativo utile alla descrizione dei processi in esame, è stato scelto di utilizzare un metodo di calcolo basato sulle densità di funzione al livello B3LYP/6-31G*, ovvero di studiare l'effetto sul potenziale di ionizzazione del pirene esercitato dalle cariche degli atomi di metallo che si trovano nelle vicinanze del fluoroforo. In assenza di cariche, la differenza di energia calcolata fra il pirene neutro e il pirene cationico è di 6.95 eV sia per il C4 che per il C11. Le cariche degli atomi metallici, calcolate utilizzando il modello che è servito precedentemente per ottimizzare le geometrie, sono positive e devono aumentare il potenziale di ionizzazione. Quando esse vengono aggiunte, è stato trovato che il potenziale di ionizzazione del pirene sale a 18.66 eV per il C4 e a 15.09 eV per il C11. Questi valori non hanno una corrispondenza sperimentale diretta, comunque indicano che il trasferimento di carica dovrebbe essere più facile(e quindi ci dovrebbe essere un maggiore effetto di spegnimento) nel caso della catena C11.

In conclusione, con questo lavoro è stato possibile chiarire come l'efficienza dello spegnimento esercitato dalle nanoparticelle di oro sulla fluorescenza del pirene venga notevolmente ridotta quando si accorcia la catena che separa il fluoroforo

dal core metallico: questo comportamento non è compatibile se si assume che tale spegnimento avvenga per effetto di un energy transfer²⁴⁻²⁸, ma risulta ragionevole se si considera che, almeno per il caso del pirene, esso sia dovuto essenzialmente all'electron transfer (figura 4.8).

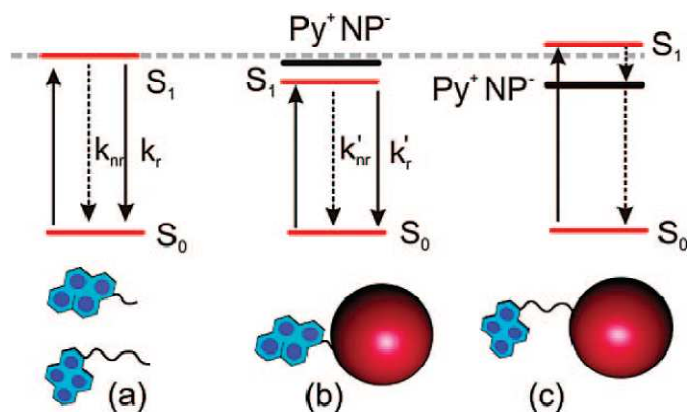


Figura 4.8. Rappresentazione schematica dei processi fotofisici che intercorrono fra nanoparticelle di oro e pirene, nel caso di leganti con differente catena. I fluorofori liberi (a) mostrano lo stesso comportamento indipendentemente dalla lunghezza della catena. Dopo la formazione del legame con il cluster di oro, le energie dello stato eccitato fluorescente e di quello a separazione di carica variano in funzione della lunghezza della catena (b) e (c).

4.6 Nanoparticelle di oro emittenti: luminescenza NIR sensibilizzata da unità pireniche.

I sistemi in grado di presentare luminescenza nella regione del vicino infrarosso (NIR), stanno sempre più catturando interesse in funzione di future applicazioni nel campo diagnostico-medico⁵⁹ e in quello delle telecomunicazioni⁶⁰. Oltre al classico approccio molecolare che ha portato alla sintesi di coloranti estremamente efficienti⁶¹, sono stati recentemente proposti materiali nanostrutturati come i “quantum dots”⁶² e i “nanorods”⁶³ che rappresentano valide alternative ai luminofori convenzionali. Nell’ambito delle nanoparticelle, non esiste una vera e propria letteratura che riporta esempi di sistemi luminescenti, ma soltanto esempi di cluster metallici le cui proprietà fotofisiche sono fortemente legati alla natura delle specie stabilizzanti. Nel caso di nanoparticelle con diametro maggiore di 2

nm, sono state osservate dal Professor Gittins e dai suoi collaboratori⁶⁴ deboli emissioni nella regione UV ($\Phi=10^{-6}$), mentre una migliore resa quantica (10^{-3}) è stata ottenuta nel vicino infrarosso nei lavori di Whetten⁶⁵ e Murray⁶⁶, utilizzando però nanoparticelle più piccole, oltre che ricoperte da un monostrato protettivo.

Per quanto riguarda sistemi basati sul trasferimento di energia da un cromoforo verso la nanoparticella, esiste un unico lavoro a cui fare riferimento⁶⁷, nel quale però solamente una piccola frazione dell'energia luminosa assorbita dal cromoforo (elettrostaticamente adsorbito alla superficie) è ceduta in maniera efficiente al cluster metallico.

In questo paragrafo verrà invece presentato un sistema in cui il trasferimento di energia è risultato molto più efficiente, e ha portato ad avere una buona luminescenza nella regione NIR da parte delle nanoparticelle di oro.

I sistemi presi in esame sono quelli di figura 4.9, in cui sono mostrate tre differenti classi di nanoparticelle, stabilizzate alla superficie da fosfine diversamente sostituite. In particolare, dalla tabella riportata, si osserva come passando dal sistema 7.1 al sistema 7.3, aumenti la concentrazione di pirene legato alla superficie delle nanoparticelle.

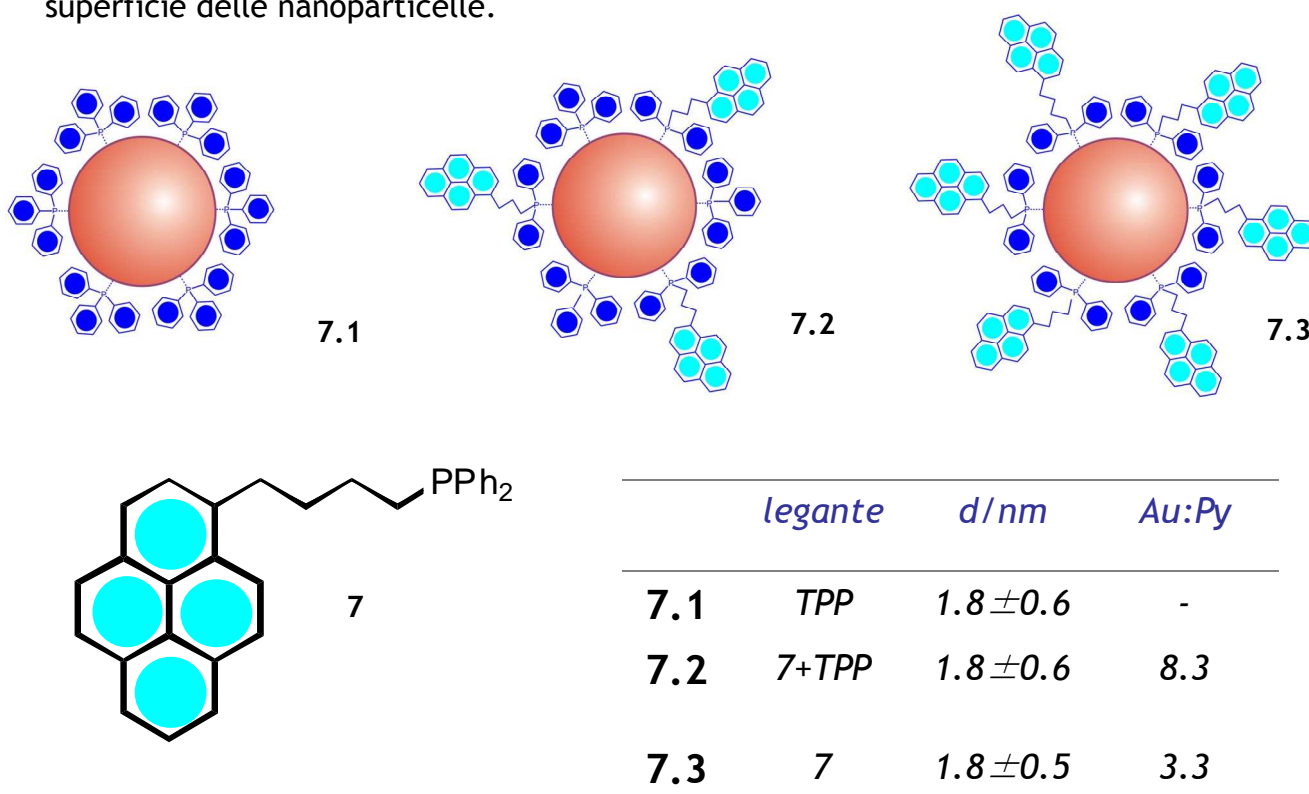


Figura 4.9. Nanoparticelle di oro funzionalizzate alla superficie con trifenilfosfina (TPP) e difenil-1-butilpirene (7)

Per questi sistemi, nel caso dell'eccitazione diretta sulla banda di risonanza plasmonica, è stato osservato un rendimento quantico che aumenta di 2 ordini di grandezza in corrispondenza dell'aumentare del rapporto 7/TPP fra le specie stabilizzanti. Se però l'eccitazione delle nanoparticelle viene effettuata sfruttando il processo di energy transfer fra pirene e superficie dei cluster di oro, si ha un aumento di 3 ordini di grandezza⁶⁸. Il composto 7 perciò può fungere da antenna, e il fenomeno di *light-harvesting* che ha luogo fa sì che si abbia una forte luminescenza NIR dalle nanoparticelle.

Gli spettri di assorbimento dei sistemi 7.2 e 7.3 mostrano un consistente contributo da parte del pirene nella zona UV, mentre sono praticamente sovrapponibili con quello del sistema 7.1 nella zona del visibile e NIR (figura 4.10a). Comunque, se gli spettri di 7.2 e 7.3 vengono confrontati con una opportuna combinazione degli spettri di 7.1 e 7 (come è stato fatto in figura 4.10b), diventa evidente come le bande di assorbimento del pirene siano significativamente allargate e spostate verso il rosso in corrispondenza del legame con la superficie di oro, il che sta ad indicare come vi sia una forte interazione fra il core d'oro e il pirene e fra i cromofori stessi⁶⁹. L'assenza di una banda di risonanza plasmonica riscontrata su tutti i campioni, è invece una conseguenza delle dimensioni ($d = 1.8 \pm 0.5$ nm), il cui valore è stato misurato negli esperimenti al microscopio a trasmissione elettronica (TEM).⁷⁰

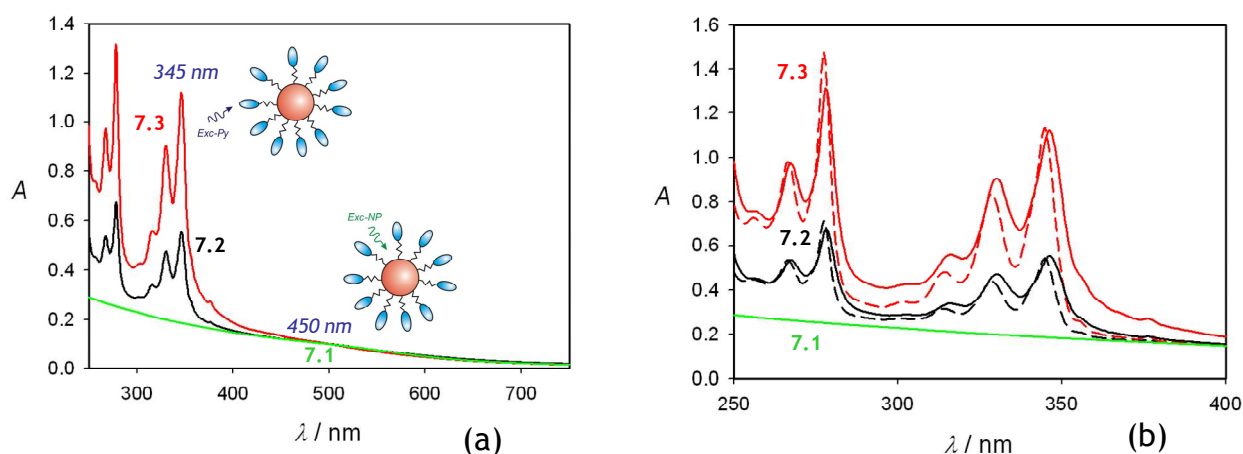


Figura 4.10. (a) Spettri di assorbimento delle nanoparticelle 7.1, 7.2, 7.3. (b) Con il tratteggio sono mostrati gli spettri di assorbimento di 7.2 e 7.3 calcolati nel caso di nessuna interazione con il core metallico (spettri somma di 7.1 e 7).

In questo lavoro è stato quindi preso in esame lo studio della luminescenza dei tre sistemi in funzione dell'eccitazione diretta del *core* metallico e di quella indiretta per mezzo dell'eccitazione del cromoforo.

Le nanoparticelle **7.1** mostrano una fluorescenza molto bassa ($\Phi < 10^{-4}$), sia per l'eccitazione a 450 nm (nella regione dove il pirene non assorbe) che per quella a 345 nm (dove il pirene assorbirebbe). Se invece si prendono in considerazione i sistemi **7.2** e **7.3** la situazione cambia radicalmente in funzione dell'aumento di concentrazione di pirene legato alla superficie. Si ha un aumento della resa quantica di emissione (localizzata nel NIR e con una forma molto allargata) di 2 volte nel caso dell'eccitazione a 450 nm, e di 3 volte nel caso dell'eccitazione a 345 nm. Dal punto di vista dei tempi di vita, sia per le nanoparticelle **7.2** che per quelle **7.3** si ha un decadimento multiesponenziale, il cui fitting ha fornito i tempi di vita medi indicati nella tabella riassuntiva di figura 4.11.

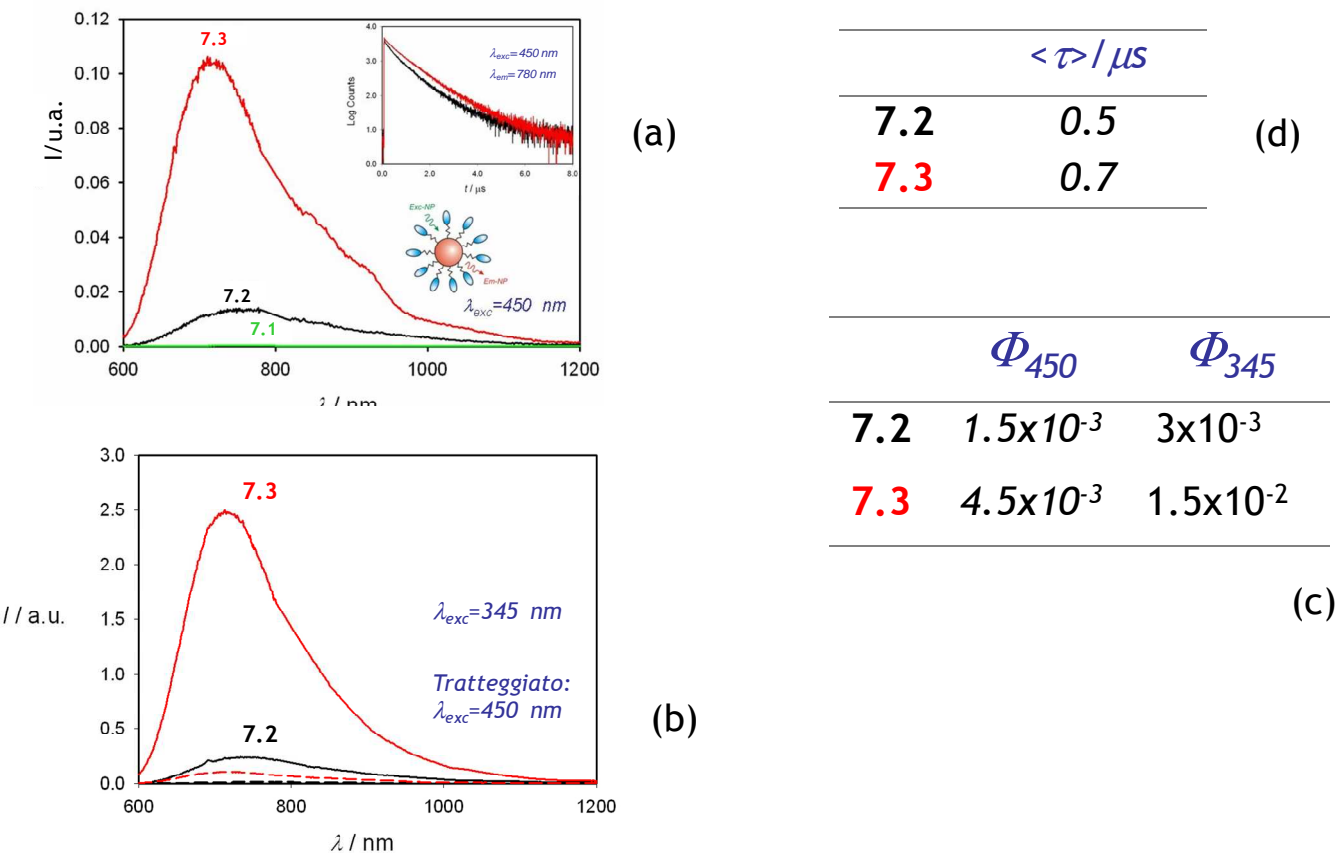


Figura 4.11. (a) Spettri di emissione ottenuti eccitando il core di oro a 450 nm. (b) Spettri di emissione ottenuti eccitando il pirene a 345 nm. (c) Confronto fra i rendimenti quantici. (d) Confronto fra i tempi di vita medi

L'allungamento dei tempi di vita osservato per le nanoparticelle 7.3 suggerisce che l'aumento di concentrazione del pirene legato alla superficie delle nanoparticelle previene la loro disattivazione non radiativa. Un confronto più indicativo si sarebbe potuto effettuare qualora si fosse potuto determinare il tempo di vita medio per l'emissione del core di oro per il sistema 7.1, ma purtroppo l'estrema debolezza di questa banda di emissione non ha permesso di effettuare questa misura.

Se si prende invece in considerazione l'emissione del pirene risultante dall'eccitazione a 345 nm delle nanoparticelle 7.2 e 7.3, (figura 4.12) si potrà osservare una banda molto debole la cui struttura è quella tipica della fluorescenza del pirene, caratterizzata però da un tempo di vita inferiore a 0.5 ns. L'elevata velocità del processo di spegnimento dell'emissione è perciò tale da prevenire la formazione di eccimeri, e la descrizione del processo fatta assumendo che si abbia il fenomeno di energy transfer fra pirene e oro trova nelle teorie di Forster⁷¹ e NSET⁷² un valido appoggio.

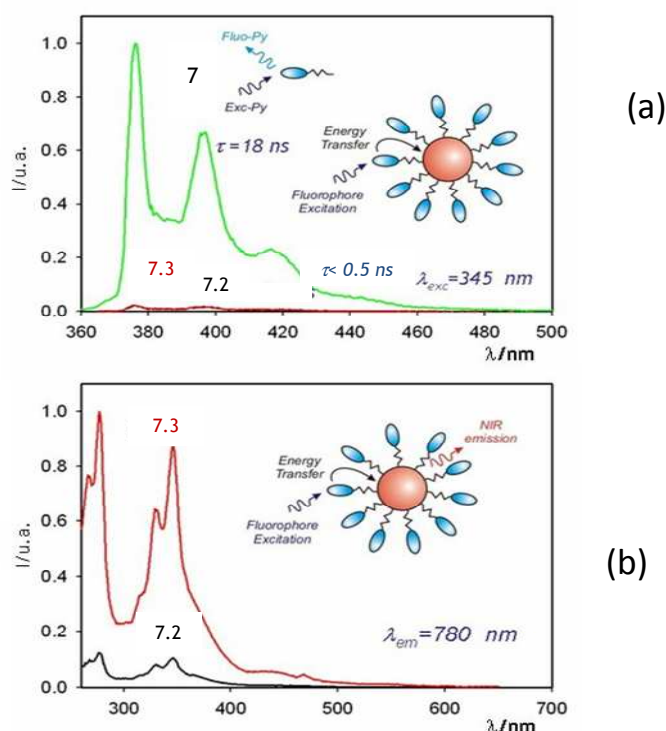


Figura 4.12. (a) Spettri di emissione del pirene per i sistemi 7.2 e 7.3 confrontati con il composto 7 libero in soluzione. (b) Spettri di eccitazione di 7.2 e 7.3 per l'emissione nel NIR ($\lambda_{em} = 780$ nm) delle nanoparticelle: è evidente il forte contributo della banda del pirene.

Nella figura 4.12 (b) sono rappresentati gli spettri di eccitazione registrati per l'emissione a 780 nm del core d'oro. Come si può notare dal profilo, il contributo del pirene risulta considerevole, e questo induce a pensare che sia molto efficiente il processo di Energy transfer, che porta all'emissione sensibilizzata da parte delle nanoparticelle di oro. Il rendimento quantico, calcolato nel caso di un processo di Energy transfer con efficienza pari al 100%, è, per quanto riguarda l'emissione sensibilizzata, molto alto sia per le particelle 7.2 che per le 7.3. Questo risultato conferma che la luminescenza dei cluster di oro è originata da stati eccitati localizzati sulla superficie metallica;^{65,66b,d} la creazione di una consistente popolazione di questi stati è perciò più efficiente se avviene attraverso il trasferimento di energia da fluorofori eccitati piuttosto che dal rilassamento conseguente alla diretta eccitazione del core di oro. Oltre a questo effetto che porta all'aumento del rendimento quantico, i fluorofori legati alla superficie ricoprono anche altri interessanti ruoli. L'efficienza di eccitazione è dipendente dall'alto coefficiente di assorbività molare e dall'elevato numero di unità di pirene legate alla superficie, oltre che dall'alta efficienza del processo di Energy transfer. L'effetto globale conseguente all'eccitazione sensibilizzata è perciò quello relativo all'aumento della lucentezza ("brightness") di un ordine di grandezza rispetto a quella per l'eccitazione diretta.

In conclusione, è stato mostrato come i sistemi descritti abbiano molte interessanti proprietà, come l'emissione NIR, l'elevato Stoke Shift e tempi di vita considerevolmente lunghi, tali da ipotizzare per loro un eventuale utilizzo in campo biologico e medico. Oltretutto, scegliendo cromofori diversi dal pirene con le opportune proprietà, si potrebbe ottenere una nuova generazione di sistemi adatti per essere utilizzati come *probe* per la regione NIR.

4.7 Esteri propargilici e Metallotropic Shift su superfici di oro: una strategia per la sintesi di nanoparticelle stabilizzate con alchini fluorescenti.

L'utilizzo di specie chimiche contenenti funzioni terminali quali i tioli, le ammine^{75,76}, gli ossoanioni^{73,74}, le polipiridine^{77,78}, i tiocianati^{78,79} e le fosfine⁸⁰ come stabilizzanti per la superficie delle nanoparticelle è un argomento su cui esiste una vasta letteratura e su cui in questo capitolo si è discusso, portando alcuni esempi di lavori portati a termine nel corso del dottorato.

La varietà delle funzioni chimiche di cui attualmente è conosciuta l'affinità per il legame e la conseguente azione stabilizzazione sui cluster d'oro permette di poter progettare materiali nanostrutturati in cui è possibile modulare l'interazione fra l'oro e particolari molecole (fotoattive, elettroattive, recettori, catene di DNA) semplicemente scegliendo opportunamente il legante.

Recentemente è stato proposto l'utilizzo di alchini terminali come "*alligator clips*" per la derivatizzazione di superfici di oro^{81,82}, includendo in questo insieme anche le nanoparticelle. Siccome gli alchini sono molto utilizzati come precursori di sintesi, si è pensato potesse essere interessante e utile studiare un loro possibile impiego nella sintesi di nanoparticelle di oro. Siccome l'indagine sull'effettiva formazione del legame con la superficie di oro la luminescenza ha fornito buoni risultati nel passato, si è pensato di adottare anche per questo sistema il medesimo approccio, prendendo in considerazione le variazioni spettrali di un cromoforo (anche in questo caso il pirene) il cui comportamento in tali condizioni è stato già ben caratterizzato. È stata quindi portata a termine la sintesi di nanoparticelle di oro⁸² e la loro ricopertura con i composti **8** e **9** di figura 4.13.

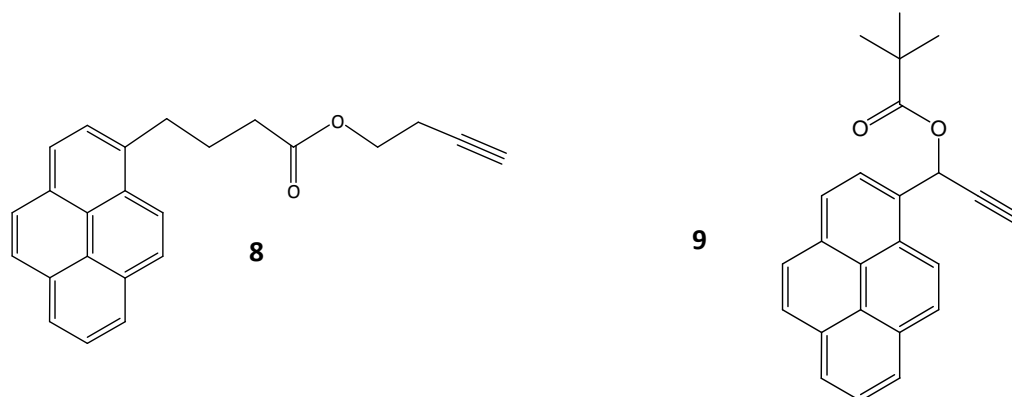


Figura 4.13. I due alchini sintetizzati ed utilizzati per la ricopertura delle nanoparticelle di oro

Nel caso delle nanoparticelle funzionalizzate con il composto **8**, sebbene la formazione dei cluster di oro sia stata evidenziata dalla comparsa della tipica banda di risonanza plasmonica, non sono state osservate variazioni significative nelle proprietà di fluorescenza del derivato del pirene. Sono stati ottenuti gli stessi risultati seguendo due differenti strategie sintetiche, la prima con il classico metodo che prevede l'introduzione di **8** direttamente in fase di sintesi, la seconda invece basata sull'iniziale preparazione di nanoparticelle debolmente stabilizzate con TOAB (tetraottilammonio bromuro) e la loro successiva derivatizzazione con **8**^{84,85}. Questo comportamento può essere motivato assumendo l'assenza di interazione fra pirene ed oro, oppure con la totale inefficienza di **8** come legante. Alla luce di quanto osservato nei lavori precedentemente illustrati, in cui si osservavano drastiche variazioni nella fotofisica del pirene legato all'oro mediante leganti simili ma con altre funzioni terminali, la seconda ipotesi risulta la più ragionevole. Sono stati registrati anche gli spettri IR di queste nanoparticelle, e si sono ottenuti profili in buon accordo con quanto ottenuto da Gorman e i suoi collaboratori⁸². E' comunque importante ricordare che lo spettro IR di questi sistemi è dominato dal segnale che proviene dallo ione tetraottilammonio presente in largo eccesso dalla sintesi e che, come conseguenza di questo, non si può prendere come evidenza dell'effettivo legame fra superficie di oro e alchino.

L'idea che comunque gli intermedi carbenoidi possano essere formati e stabilizzati dalle interazioni fra gli alchini con le nanoparticelle di oro, permettendo la sintesi di nuovi ed interessanti coniugati d'oro^{81,82,86} ha spinto a proseguire la ricerca in

tal senso. Benchè siano stati fatti progressi molto limitati nell'isolamento di complessi di oro a carattere carbenoide, esistono evidenze teoriche e sperimentali che suggeriscono come vi sia la possibilità per l'oro di stabilire un legame di retrodonazione sul LUMO di cationi legati attraverso un legame σ .

Gli intermedi carbenoidi sono presenti oltre che nel riarrangiamento di Rautenstrauch catalizzato da Au(I), anche nelle reazioni di cicloprotonazione. In entrambe queste reazioni, sono interessati acetossi e pivaloyl alchini. Per questo è stata così portata a termine la sintesi del composto **9**.

Se una soluzione di **9** è aggiunta ad una soluzione di nanoparticelle protette da TOAB, lo spettro di fluorescenza registrato immediatamente dopo l'aggiunta è quello che ci si aspetta nel caso di assenza di interazioni pirene-oro (figura 4.14). Dopo qualche ora però, viene raggiunta una situazione stazionaria in cui l'area sottesa dal profilo di emissione risulta diminuita solo di un 5% rispetto a quella iniziale e la banda presenta una forma decisamente perturbata. Questa situazione è la stessa che è stata osservata in passato per altri derivati del pirene legati alle nanoparticelle di oro^{75,80,84} oppure alle superfici di silicio⁹⁰. Queste variazioni spingono quindi a pensare che l'alchino in questo caso si leghi all'oro.

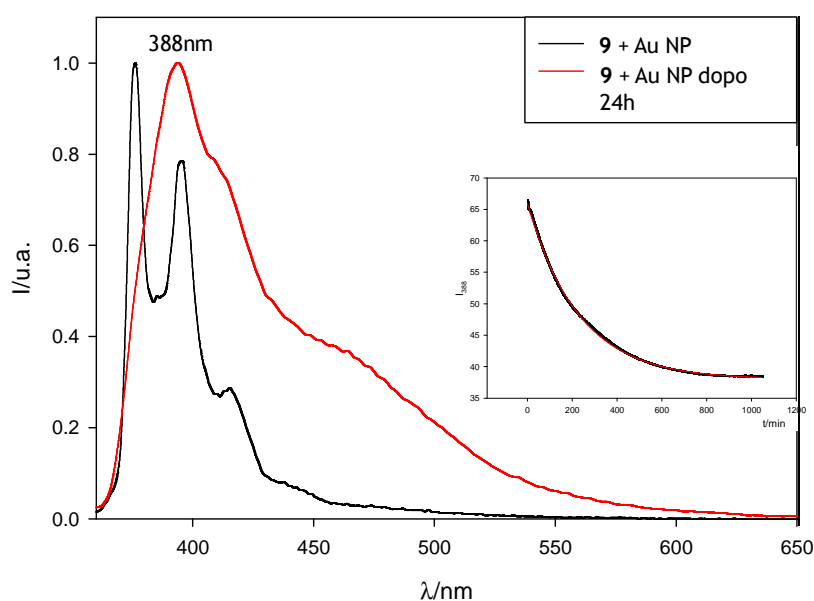


Figura 4.14. Spettri di fluorescenza normalizzata ($\lambda_{\text{ecc}} = 340 \text{ nm}$) di una soluzione che contiene nanoparticelle di oro stabilizzate con TOAB registrati immediatamente dopo l'aggiunta di **9** (in nero) e dopo 24 ore (in rosso). Nel riquadro viene mostrato come l'intensità di emissione a 388 varia in funzione del tempo.

Anche gli spettri di assorbimento presentano interessanti variazioni. Immediatamente dopo l'aggiunta, il profilo è sovrapponibile allo spettro somma delle nanoparticelle di oro e di **9**. Dopo qualche ora però la tipica banda strutturata del pirene subisce un effetto batocromico e diviene più larga e meno intensa. Questi risultati sono in pieno accordo con quanto riportato in letteratura nei casi di interazione di un derivato del pirene con il core di una nanoparticella metallica. Oltre a questo, sono rilevabili anche piccole variazioni nella plasmon resonance band delle nanoparticelle. In figura 4.15 sono rappresentati i profili di assorbimento.

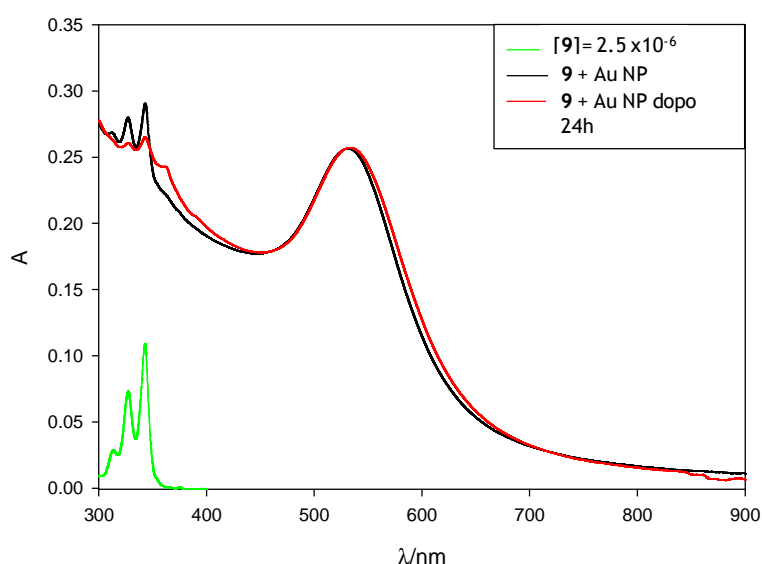


Figura 4.15. Spettri di assorbimento di una soluzione di **9** (in verde) a concentrazione 2.5×10^{-6} M. Dopo l'aggiunta della stessa concentrazione di **9** ad una soluzione di nanoparticelle di oro, si ottengono i profili in nero (immediatamente dopo) e in rosso (dopo 24h). Si notano, nella regione spettrale in cui assorbe il pirene, mutazioni nella struttura tipica della banda.

Dopo 24 ore, in corrispondenza del raggiungimento della situazione stazionaria, per avere una idea delle dimensioni delle nanoparticelle ottenute, sono state scattate delle immagini al microscopio TEM, riportate nella figura 4.16. Il trattamento statistico relativo al calcolo del diametro medio ha fornito come risultato il valore di 5.6 ± 0.4 nm.

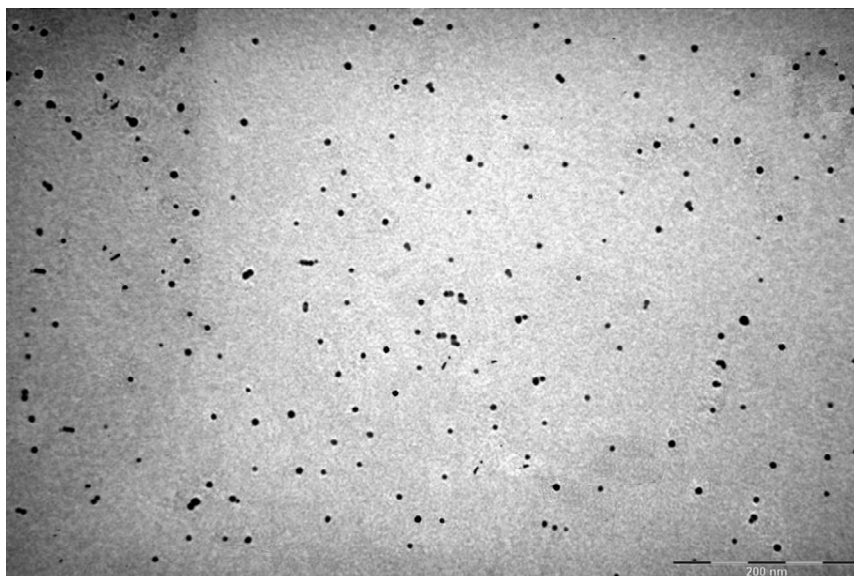


Figura 4.16. Immagine TEM delle nanoparticelle di Au stabilizzate con il composto **9**, con un diametro medio di 5.6 ± 0.4 nm.

Concludendo, con questo lavoro è stata presentata la sintesi di una nuova classe di nanoparticelle di oro stabilizzate in superficie da una specie contenente un alchino terminale. Il composto **9** è stato sintetizzato con l'idea che avesse una buona tendenza a riarrangiare per formare intermedi carbenoidi con l'oro, risultato che è stato raggiunto.

4.8 Bibliografia

1. a) Shaw CF III (1999) Gold-Based Medicinal Agents. *Chem. Rev.* 99: 2589-2600; b) [Higby GJ](#) (1982) Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900. *Gold Bull.* 15: 130-140; c) Brown DH, Smith WE (1980) The Chemistry of the Gold Drugs Used in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Chem. Soc. Rev.* 9: 217-240; d) Gibson CS (1938) Gold in medicine. *Chemical Products and Chemical News* 1: 35-36
2. a) Sato K, Hosokawa K, Maeda M (2005) Non-cross-linking gold nanoparticle aggregation as a detection method for single-base substitutions. *Nucl. Acids Res.* 33: e4/1-e4/5; b) Sonvico F, Dubernet C, Colombo P, Couvreur P (2005) Metallic colloid nanotechnology, applications in diagnosis and therapeutics. *Curr. Pharm. Design* 11: 2091-2105; c) Hyatt AD, Eaton BT (1993) *Immuno-Gold Electron Microscopy in Virus Diagnosis and Research*. CRC Press, Boca Raton; d) Eagle H (1932) Applications of colloid chemistry in the serum diagnosis of syphilis. *J. Phys. Chem.* 36: 259-267; e) Kahn RL (1929) Serum Diagnosis for Syphilis. In: Alexander J (ed) *Colloid Chemistry: Theoretical and Applied*. The Chemical Catalog Co., New York, vol. II Biology and Medicine, pp 757
3. Helcher HH (1718) *Aurum potabile oder Gold tinstur*. Johann Herbord Klossen, Breslau and Leipzig
4. a) Sato K, Hosokawa K, Maeda M (2005) Non-cross-linking gold nanoparticle aggregation as a detection method for single-base substitutions. *Nucl. Acids Res.* 33: e4/1-e4/5; b) Sonvico F, Dubernet C, Colombo P, Couvreur P (2005) Metallic colloid nanotechnology, applications in diagnosis and therapeutics. *Curr. Pharm. Design* 11: 2091-2105; c) Hyatt AD, Eaton BT (1993) *Immuno-Gold Electron Microscopy in Virus Diagnosis and Research*. CRC Press, Boca Raton; d) Eagle H (1932) Applications of colloid chemistry in the serum

- diagnosis of syphilis. *J. Phys. Chem.* 36: 259-267; e) Kahn RL (1929) Serum Diagnosis for Syphilis. In: Alexander J (ed) *Colloid Chemistry: Theoretical and Applied*. The Chemical Catalog Co., New York, vol. II Biology and Medicine, pp 757
5. Helcher HH (1718) *Aurum potabile oder Gold tinstur*. Johann Herbord Klossen, Breslau and Leipzig
 6. Faraday M (1875) Experimental relations of Gold (and other metals) to light. *Philos. Trans.* 147: 145-181
 7. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman RJ (1994) Synthesis of thiol-derivatized Gold nanoparticles in a twophase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 801-802
 8. a) Fiorani D (2005) *Surface effects in magnetic nanoparticles*. Springer; b) Schmid G (2004) *Nanoparticles: from theory to application*. John Wiley & Sons; c) Rotello V (2003) *Nanoparticles: building blocks for Nanotechnology*. Springer; d) Heilmann A (2002) *Polymer films with embedded metal nanoparticles*. Springer; e) Feldheim DL, Foss CA Jr, (2002) *Metal Nanoparticles: synthesis, characterization and applications*. Marcel Dekker, New York; f) Fendler JH (1998) *Nanoparticles and nanostructured films: preparation, characterization and applications*. Wiley-VCH
 9. a) Daniel MC, Astruc D (2004) Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104: 293-346; b) Aslan K, Zhang J, Lakowicz JR, Geddes CD (2004) Saccharide sensing using gold and silver nanoparticles A review. *Journal of Fluorescence* 14: 391-400; c) Thomas KG, Kamat PV (2003) Chromophore-functionalized gold nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* 36: 888-898; d) Schmid G, Corain B (2003) Nanoparticulated gold: syntheses, structures, electronics, and reactivities. *Eur. J. Inorg. Chem.* 17: 3081-3098; e) Zhong Z, Male KB, Luong JHT (2003) More recent progress in the preparation of Au nanostructures, properties, and applications. *Anal. Lett.* 36: 3097-3118; f) Jain KK (2003)

- Nanodiagnostics: application of nanotechnology in molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3: 153-161; g) McMillan RA, Andrew R (2003) Biomolecular templates: nanoparticles align. *Nature Mater.* 2: 214-215; h) Csaki A, Moller R, Fritzsche W (2002) Gold nanoparticles as novel label for DNA diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2: 187-193; i) Brust M, Kiely CJ (2002) Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. *Colloids and Surfaces, A: Physicochem. Eng. Aspects* 202: 175-186
10. Mie G (1908) Contributions to the Optics of Turbid Media, Especially Colloidal Metal Solutions. *Annal. Phys.* 25: 377-445
11. a) Devarajan S, Sampath S (2004) Electrochemistry with nanoparticles. In: Rao CNR, Mueller A, Cheetham AK (eds) *Chemistry of Nanomaterials*, Wiley-VCH, Weinheim, pp 646-687; b) Liljeroth P, Quinn BM, Ruiz V, Kontturi K (2003) Charge injection and lateral conductivity in monolayers of metallic nanoparticles. *Chem. Comm.* 1570-1571; c) Hicks JF, Miles DT, Murray RW (2002) Quantized double-layer charging of highly monodisperse metal nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 13322-13328; d) Chen S, Pei R, Zhao T, Dyer DJ (2002) Gold nanoparticle assemblies by metal ion-pyridine complexation and their rectified quantized charging in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. B* 106: 1903-1908; e) Chen S, Murray RW (1999) Electrochemical quantized capacitance charging of surface ensembles of gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 103: 9996-10000; f) Chen S, Ingram RS, Hostetler MJ, Pietron JJ, Murray RW, Schaaff TG, Khoury JT, Alvarez MM, Whetten RL (1998) Gold nanoelectrodes of varied size: transition to molecule-like charging. *Science* 280: 2098-2101
12. Quinn BM, Liljeroth P, Ruiz V, Laaksonen T, Kontturi K (2003) Electrochemical resolution of 15 oxidation states for monolayer protected gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 6644-6645
13. a) Chen S, Murray RW, Feldberg SW (1998) Quantized capacitance charging of monolayer-protected Au clusters. *J. Phys. Chem. B* 102: 9898-9907; b)

- Hofstetter W, Zwerger W (1997) Single-electron box and the helicity modulus of an inverse square XY model. *Phys. Rev. Lett.* 78: 3737-3740; c) Hartmann E, Marquardt P, Ditterich J, Radojkovic P, Steinberger H (1996) Characterisation and utilization of the context-dependent physical properties of nanoparticles for nanostructures investigated by scanning tunneling microscopy. *Appl. Surf. Sci.* 107: 197-202; d) Amman M, Wilkins R, Ben-Jacob E, Maker PD, Jaklevic RC (1991) Analytic solution for the current-voltage characteristic of two mesoscopic tunnel junctions coupled in series, *Phys. Rev. B* 43: 1146-1149
14. a) Speets EA, Dordi B, Ravoo BJ, Oncel N, Hallbaeck AS, Zandvliet HJW, Poelsema B, Rijnders G, Blank DHA, Reinhoudt DN (2005) Noble metal nanoparticles deposited on self-assembled monolayers by pulsed laser deposition show Coulomb blockade at room temperature. *Small* 1: 395-398; b) Yang Y, Nogami M (2005) [Room temperature single electron transistor with two-dimensional array of Au-SiO₂ core-shell nanoparticles](#). *Sci. Tech. Adv. Mat.* 6: 71-75; c) Chaki NK, Singh P, Dharmadhikari CV, Vijayamohanan, KP (2004) Single-Electron Charging Features of Larger, Dodecanethiol-Protected Gold Nanoclusters: Electrochemical and Scanning Tunneling Microscopy Studies. *Langmuir* 20: 10208-10217; d) Khomutov GB, Kislov VV, Gainutdinov RV, Gubin SP, Obydenov AY, Pavlov SA, Sergeev-Cherenkov AN, Soldatov ES, Tolstikhina AL, Trifonov AS (2003) The design, fabrication and characterization of controlled-morphology nanomaterials and functional planar molecular nanocluster-based nanostructures. *Surf. Sci.* 532-535: 287-293; e) Chaki NK, Gopakumar TG, Maddanimath T, Aslam M, Vijayamohanan K (2003) Effect of chain length on the tunneling conductance of gold quantum dots at room temperature. *J. Appl. Phys.* 94: 3663-3666; f) Suganuma Y, Trudeau PE, Dhirani AA (2002) Probing correlated current and force effects of nanoparticle charge states by hybrid STM-AFM. *Phys. Rev. B* 66: 241405/1-241405/4; g) Rolandi M, Scott K, Wilson EG, Meldrum FC (2001) Manipulation and immobilization of alkane-coated gold nanocrystals using

- scanning tunneling microscopy. *J. Appl. Phys.* 89: 1588-1595; h) Ingram RS, Hostetler MJ, Murray RW, Schaaff TG, Khoury J, Whetten RL, Bigioni TP, Guthrie DK, First PN (1997) 28 kDa alkanethiolate-protected Au clusters give analogous solution electrochemistry and STM Coulomb staircases. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 9279-9280
15. a) Schmid G, Simon U (2005) Gold nanoparticles: assembly and electrical properties in 1-3 dimensions. *Chem. Comm.* 697-710; b) Boyen HG, Ethirajan A, Kastle G, Weigl F, Ziemann P, Schmid G, Garnier MG, Buttner M, Oelhafen P (2005) Alloy formation of supported gold nanoparticles at their transition from clusters to solids: Does size matter? *Phys. Rev. Lett.* 94: 016804/1-016804/4; c) Torma V, Vidoni O, Simon U, Schmid G (2003) Charge-transfer mechanisms between gold clusters. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1121-1127; d) Boyen HG, Kaestle G, Weigl F, Koslowski B, Dietrich C, Ziemann P, Spatz JP, Riethmueller S, Hartmann C, Moeller M, Schmid G, Garnier MG, Oelhafen P (2002) Oxidation-resistant gold-55 clusters. *Science* 297: 1533-1536; e) Schmid G (2001) Metals. In: Klabunde KJ (ed) *Nanoscale materials in chemistry*. John Wiley & Sons Inc., New York, pp 15-59; f) Sawitowski T, Miquel Y, Heilmann A, Schmid G (2001) Optical properties of quasi one-dimensional chains of gold nanoparticles. *Adv. Func. Mat.* 11: 435-440
16. Prodi L (2005) Luminescent chemosensors: from molecules to nanoparticles. *New J. Chem.* 29: 20-31
17. Turkevitch J, Stevenson PC, Hillier J (1951) Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11: 55-75
18. a) Iwamoto M, Kuroda K, Kanzow J, Hayashi S, Faupel F (2005) Size evolution effect of the reduction rate on the synthesis of gold nanoparticles. *Adv. Pow. Tech.* 16: 137-144, b) Donkers RL, Song Y, Murray RW (2004) Substituent effects on the exchange dynamics of ligands on 1.6 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir* 20: 4703-4707; c) Chen S, Templeton AC, Murray RW (2000) Monolayer-protected cluster growth dynamics. *Langmuir* 16: 3543-3548

19. a) Guo R, Song Y, Wang G, Murray RW (2005) Does core size matter in the kinetics of ligand exchanges of monolayer-protected Au clusters? *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2752-2757; b) Hostetler MJ, Templeton AC, Murray RW (1999) Dynamics of place-exchange reactions on monolayer-protected gold cluster molecules. *Langmuir* 15: 3782-3789; c) Ingram RS, Hostetler MJ, Murray RW (1997) Poly-hetero- π -functionalized alkanethiolate-stabilized gold cluster compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 9175-9178
20. George TK, Zajicek J, Kamat PV (2002) Surface binding properties of tetraoctylammomium bromide capped gold nanoparticles. *Langmuir* 18: 3722-3727
21. Fitzmaurice D, Rao SN, Preece JA, Stoddart JF, Wenger S, Zaccheroni N (1999) Heterosupramolecular chemistry: programmed pseudorotaxane assembly at the surface of a nanocrystal. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 1147-1150
22. a) Ghosh SK, Nath S, Kundu S, Esumi K, Pal T (2004) Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold colloids. *J. Phys. Chem. B* 108: 13963-13971; b) Link S, El-Sayed MA (1999) Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 103: 4212-4217
23. Canepa M, Fox MA, Whitesell JK (2003) The influence of core size on electronic coupling in shell-core nanoparticles: gold clusters capped with pyrenoxylalkylthiolate. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 1177-1180
24. Ruppel, R. Decay of an Excited Molecule Near a Small Metal Sphere. *J. Chem. Phys.* 1982, 76, 1681-1684.
25. Gersten, J.; Nitzan, A. Spectroscopic Properties of Molecules Interacting with Small Dielectric Particles. *J. Chem. Phys.* 1981, 75, 1139-1152.
26. Levi, S.; Mourran, A.; Spatz, J. P.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; Möller, M. Fluorescence of Dyes Adsorbed on Highly Organized, Nanostructured Gold Surfaces. *Chem.OEur. J.* 2002, 8, 3808-3814.

27. Dulkeith, E.; Morteaux, A. C.; Niedereichholz, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Levi, S.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N.; Möller, M.; Gittins, D. I. Fluorescence Quenching of Dye Molecules near Gold Nanoparticles: Radiative and Nonradiative Effects. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 203002.
28. Dulkeith, E.; Ringler, M.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; Muñoz Javier, A.; Parak, W. J. Gold Nanoparticles Quench Fluorescence by Phase Induced Radiative Rate Suppression. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 585-589.
29. Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. J. Single-Mismatch Detection Using Gold-Quenched Fluorescent Oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365-370.
30. Fan, C.; Wang, S.; Hong, J. W.; Bazan, G. C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. Beyond Superquenching: Hyper-Efficient Energy Transfer from Conjugated Polymers to Gold Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 6297- 6301.
31. Huang, C. C.; Chang, H. T. Selective Gold-Nanoparticle- Based “Turn-On” Fluorescent Sensors for Detection of Mercury(II) in Aqueous Solution. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8332-8338.
32. Cannone, F.; Chirico, G.; Bizzarri, A. R.; Cannistraro, S. J. Quenching and Blinking of Fluorescence of a Single Dye Molecule Bound to Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16491-16498.
33. Wu, C. F.; Szymanski, C.; McNeill, J. Preparation and Encapsulation of Highly Fluorescent Conjugated Polymer Nanoparticles. *Langmuir* **2006**, *22*, 2956-2960.
34. Jennings, T. L.; Singh, M. P.; Strouse, G. F. Fluorescent Lifetime Quenching Near $d \sim 1.5$ nm Gold Nanoparticles: Probing NSET Validity. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5462-5467.
35. Jennings, T. L.; Schlatterer, J. C.; Singh, M. P.; Greenbaum, N. L.; Strouse, G. F. NSET Molecular Beacon Analysis of Hammerhead RNA Substrate Binding and Catalysis. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1318-1324.

36. Yun, C. S.; Javier, A.; Jennings, T.; Fisher, M.; Hira, S.; Peterson, S.; Hopkins, B.; Reich, N. O.; Strouse, G. F. Nanometal Surface Energy Transfer in Optical Rulers, Breaking the FRET Barrier. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3115-3119.
37. Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L. Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 113002.
38. Tovmachenko, O. G.; Graf, C.; van den Heuvel, D. J.; van Blaaderen, A.; Gerritsen, H. C. Fluorescence Enhancement by Metal-Core/Silica-Shell Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 91-95.
39. Tam, F.; Goodrich, G. P.; Johnson, B. R.; Halas, N. J. Plasmonic Enhancement of Molecular Fluorescence. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 496-501.
40. Cheng, D. M.; Xu, Q. H. Separation Distance Dependent Fluorescence Enhancement of Fluorescein Isothiocyanate by Silver Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2007**, 248-250.
41. Aslan, K.; Wu, M.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Fluorescent Core-Shell Ag@SiO₂ Nanocomposites for Metal- Enhanced Fluorescence and Single Nanoparticle Sensing Platforms. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1524-1525.
42. Enderlein, J. Theoretical Study of Single Molecule Fluorescence in a Metallic Nanocavity. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 315-317.
43. Zhang, J.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Lakowicz, J. R. Dye- Labeled Silver Nanoshell-Bright Particle. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 8986-8991.
44. Thomas, K, G.; Kamat, P. V. Making Gold Nanoparticles Glow: Enhanced Emission from a Surface-Bound Fluoroprobe. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2655-2656.
45. Ipe, B. I.; Thomas, K. G.; Barazzouk, S.; Hotchandani, S.; Kamat, P. V. Photoinduced Charge Separation in a Fluorophore-Gold Nanoassembly. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 18-21.
46. Kamat, P. V.; Barazzouk, S.; Hotchandani, S. Electrochemical Modulation of Fluorophore Emission on a Nanostructured Gold Film. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2764-2767.

47. Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Baxter, R.; Teobaldi, G.; Zerbetto, F. Kinetics of Place-Exchange Reactions of Thiols on Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2003**, *19*, 5172-5174.
48. Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Battistini, G. Modulation of the Photophysical Properties of Gold Nanoparticles by Accurate Control of the Surface Coverage. *Langmuir* **2004**, *20*, 7884-7886.
49. Ipe, B. I.; Thomas, K. G. Investigations on Nanoparticle_Chromophore and Interchromophore Interactions in Pirene- Capped Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 13265-13272.
50. Wang, T. X.; Zhang, D. Q.; Xu, W.; Yang, J. L.; Han, R.; Zhu, D. B. Preparation, Characterization, and Photophysical Properties of Alkanethiols with Pirene Units-Capped Gold Nanoparticles: Unusual Fluorescence Enhancement for the Aged Solutions of These Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2002**, *18*, 1840-1848.
51. Ming, M.; Chen, M. M. Y.; Katz, A. Steady-State Fluorescence-Based Investigation of the Interaction Between Protected Thiols and Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2002**, *18*, 2413-2420.
52. Boal, A. K.; Rotello, V. Radial Control of Recognition and Redox Processes with Multivalent Nanoparticle Hosts. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5019-5024.
53. Deng, J. P.; Wu, C. H.; Yang, C. H.; Mou, C. Y. Pirene- Assisted Synthesis of Size-Controlled Gold Nanoparticles in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles. *Langmuir* **2005**, *21*, 8947-8951.
54. Werts, M. H. V.; Zaim, H.; Blanchard-Desce, M. Excimer probe of the Binding of Alkyl Disulfides to Gold Nanoparticles and Subsequent Monolayer Dynamics. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 29-32.
55. Shirdel, J.; Penzkofer, A.; Procházka, R.; Shen, Z.; Strauss, J.; Daub, J. Absorption and Emission Spectroscopic Characterisation of a Pirene-Flavin Dyad. *Chem. Phys.* **2007**, *331*, 427-437.

56. Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T. *Handbook of Photochemistry*; CRC Press, Boca Raton, FL, 2006.
57. Credi, A.; Prodi, L. From Observed to Corrected Luminescence Intensity of Solution Systems: An Easy-to-Apply Correction Method for Standard Spectrofluorimeters. *Spectrochim. Acta, Part A* **1998**, *54*, 159-170.
58. Franzen, S.; Folmer, J. C. W.; Glomm, W. R.; O'Neal, R. Optical Properties of Dye Molecules Adsorbed on Single Gold and Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 6533-6540.
59. Weissleder, R.; Ntziachristos, V. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 123-128.
60. See, for example: Buenzli, J.-C. G.; Piguet, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048-1077 and references therein.
61. Daehne, S.; Resh-Genger, U.; Wolfbeis, O. S., Eds. *Near Infrared Dyes for High Technology Applications*; NATO Advanced Study Institute Series Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1998.
62. Sargent, E. H. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 515-522.
63. Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2115-2120.
64. Dulkeith, E.; Niedereichholz, T.; Klar, T. A.; Feldmann, J.; von Plessen, G.; Gittins, D. I.; Mayya, K. S.; Caruso, F. *Phys. Rev. B* **2004**, *70*, 205424.
65. Link, S.; Beeby, A.; Fitzgerald El-Sayed, S. M. A.; Schaaff, T. G.; Whetten, R. L. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 3410-3415.
66. (a) Lee, D.; Donkers, R. L.; Wang, G.; Harper, A. S.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6193-6199. (b) Wang, G.; Huang, T.; Murray, R. W.; Menard, L.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 812-813. (c) Huang, T.; Murray, R. W. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2498-2502. (d) Wang, G.; Guo, R.; Kalyuzhny, G.; Choi, J.-P.; Murray, R. W. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20282-20289.
67. Cheng, P. P. H.; Silvester, D.; Wang, G.; Kalyuzhny, G.; Douglas, A.; Murray, R. W. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 4637-4644.

68. Several examples of nonluminescent nanoparticles with pirene-tailed ligands have been reported. See, for example: (a) Ipe, B. I.; Thomas, K. G.; Barazzouk, S.; Hotchandani, S.; Kamat, P. V. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 18-21. (b) Kamat, P. V.; Barazzouk, S.; Hotchandani, S. *Angew Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2764-2767, (c) Ipe, B. I.; Thomas, K. G. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 13265-13272, (d) Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Battistini, G. *Langmuir* **2004**, *20*, 7884-7886. (e) Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Baxter, R.; Teobaldi, G.; Zerbetto, F. *Langmuir* **2003**, *19*, 5172-5174. (f) Chen, M. M. Y.; Katz, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 2413-2420. (g) Deng, J. P.; Wu, C.; Yang, C. H.; Mou, C. Y. *Langmuir* **2005**, *21*, 8947-8951. (h) Boal, A. K.; Rotello, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5019-5024.
69. Both interfluorophore and fluorophore-metal interactions may be responsible for such effect. See also ref 11d.
70. (a) Schaaff, T. G.; Shafigullin, M. N.; Khoury, J. T.; Vezmar, I.; Whetten, R. L.; Cullen, W. G.; First, P. N.; Gutierrez-Wing, C.; Ascensio, J.; Jose-Yacaman, M. J. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 7885-7891. (b) Alvarez, M. M.; Khoury, J. T.; Schaaff, T. G.; Shafigullin, M. N.; Vezmar, I.; Whetten, R. L. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3706-3712.
71. Foerster, T. *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7-17.
72. Jennings, T. L.; Singh, M. P. G.; Strouse, F. J. *Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5462-5467.
73. S. L. Cumberland, and G. F. Strouse, *Langmuir*, 2002, **18**, 269-276.
74. R. L. Donkers, Y. Song, and R. W. Murray, *Langmuir*, 2004, **20**, 4703-4707.
75. K. G. Thomas, and P. V. Kamat, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 2655-2656.
76. K. G. Thomas, J. Zajicek, and P. V. Kamat, *Langmuir*, 2002, **18**, 3722-3727.
77. M. Jurkiewicz-Herbich, R. Slojowska, K. Zawada, and J. Bukowska, *Electrochim. Acta.*, 2002, **47**, 2429-2434.
78. H. Fang, C. Du, S. Qu, Y. Li, Y. Song, H. Li, H. Liu, and D. Zhu, *Chem. Phys. Lett.* 2002, **364**, 290-296.

79. J. W. Ciszek, Z. K. Keane, L. Cheng, M. P. Stewart, L. H. Yu, D. Natelson, and J. M. Tour, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 3179-3189.
80. M. Montalti, N. Zaccheroni, L. Prodi, N. O'Reilly, and S. L. James, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2418-2419.
81. A. M. McDonagh, M. H. Zareie, M. J. Ford, C. S. Barton, M. Ginic-Markovic, and J. G. Matison, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, **129**, 3533-3538.
82. S. Zhang, K. L. Chandra, and C. B. Gorman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 4876-4877.
83. M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, and G. Falini, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 13540-13546; M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, A. Zattoni, P. Reschiglian, and G. Falini, *Langmuir*, 2004, **20**, 2989-2991; Prodi, L. *New J. Chem.*, 2005, **29**, 20-31; M. Montalti, L. Prodi, and N. Zaccheroni, *J. Mater. Chem.* 2005, **15**, 2810-2814; M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Battistini, S. Marcuz, F. Mancin, E. Rampazzo, and U. Tonellato, *Langmuir*, 2006, **22**, 5877-5881.
84. B. I. Ipe, K. G. Thomas, S. Barazzouk, S. Hotchandani, and P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 18-21; P. V. Kamat, S. Barazzouk, and S. Hotchandani, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 2764-2767; M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, R. Baxter, G. Teobaldi, and F. Zerbetto, *Langmuir*, 2003, **19**, 5172-5174; M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, and G. Battistini, *Langmuir*, 2004, **20**, 7884-7886; B. I. Ipe, and K. G. Thomas, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 13265-13272.
85. M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, M. Beltrame, T. Morotti, and S. Quici, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 102-108.
86. M. J. Ford, R. C. Hoft, and A. J. McDonagh, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 20387-20392.
87. P. Pyykkö, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 4412-4456; H. G. Raubenheimer, M. W. Esterhuysen, A. Timoshkin, Y. Chen, and G. Frenking, *Organometallics*, 2002, **21**, 3173-3181.

88. X. Shi, D. J. Gorin, and F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 5802-5803.
89. M. J. Johansson, D. J. Gorin, S. T. Staben, and F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 18002-18003.
90. M. Busi, M. Laurenti, G. G. Condorelli, A. Motta, M. Favazza, I. L. Fragalà, M. Montalti, L. Prodi, and E. Dalcanale, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 6891-6898.

CAPITOLO 5

UNA NUOVA SONDA FLUORESCENTE PER SUPERFICI DI SILICIO NANOFUNZIONALIZZATE

5.1 Introduzione

Il *Self-Assembly*, definito come il fenomeno spontaneo che sfrutta la capacità che determinate molecole hanno di riconoscersi e dar luogo a nuovi addotti, è l'approccio attualmente più promettente per la concezione di innovativi materiali nanostrutturati dotati di particolari proprietà.

Una caratteristica distintiva di tali strutture è che, a differenza dei materiali cosiddetti macroscopici, esse posseggono una consistente percentuale delle specie che le costituiscono disposte sulla superficie.

Essendo che il volume di un oggetto, caratterizzato da una dimensione l , diminuisce più velocemente della sua area in corrispondenza della diminuzione di l ($V \propto l^3$, $S \propto l^2$, quindi $S/V \propto l^{-1}$), ne consegue che, in casi estremi, si possano avere strutture dove quasi ogni atomo si trova in superficie: si parla così di nanostrutture “*all surface*”, che possono in un certo senso essere intese come il “quarto stato della materia”.

Atomi o molecole disposti sulla superficie di un materiale si trovano così in un ambiente completamente diverso da quello che troverebbero all'interno e quindi sono caratterizzati da differenti parametri energetici (energia libera, stati elettronici) che influiscono su caratteristiche come la reattività e la mobilità.

Viene da sé quindi affermare che nei materiali nanostrutturati le proprietà fisiche sono per lo più in relazione a quelle delle specie che si trovano in superficie, mentre per i materiali *bulk*, caratteristiche come la conducibilità, la durezza, la

plasticità sono fortemente condizionate dalla composizione e struttura chimica degli atomi e delle molecole all'interno del materiale.

In questa ottica, esiste una vasta letteratura incentrata sullo studio di superfici nanostrutturate ottenute per *self-assembly* di specie organiche con determinate proprietà, i cosiddetti SAMs (*self-assembled monolayers*)¹.

I SAMs sono definiti come “assemblaggi” organici che si formano per adsorbimento di costituenti molecolari da una soluzione o da un gas su una superficie solida (oppure liquida, come nel caso del mercurio). La specie adsorbita, caratterizzata dalla presenza di una funzionalità affine alla superficie, si organizza spontaneamente (e qualche volta epitassialmente) in strutture cristalline (o semicristalline) dando così luogo al monostrato.

La classe più studiata di SAMs è quella che deriva dall'adsorbimento di alcantioli su superfici di oro, argento, rame, palladio, platino e mercurio, mentre recentemente l'interesse della ricerca si sta spostando sempre più verso le superfici di silicio, visto e considerato il loro grande e diffuso utilizzo nelle apparecchiature elettroniche più avanzate.

L'ostacolo maggiore che è stato incontrato per lo sviluppo di questi materiali è quello relativo alla loro caratterizzazione ma, grazie ai recenti progressi che sono stati compiuti nelle varie tecniche analitiche, sono stati fatti notevoli passi in avanti.

A testimonianza di questo, risulta utile ed interessante introdurre brevemente un lavoro recentemente pubblicato in cui il *self-assembly* su superfici di silice opportunamente derivatizzate è stato ottenuto sfruttando l'effetto coordinante di un metallo (Pt)².

Alla luce dell'interesse scientifico suscitato, il lavoro illustrato in questo capitolo è mirato a mettere in evidenza gli incoraggianti risultati ottenuti riguardo la caratterizzazione fotofisica di una nuova sonda fluorescente, la cui implementazione su superficie di silicio, che sembra promettere molto bene, è in fase di progettazione.

5.2 Self-Assembly di nanogabbie di coordinazione su superfici Si(100)

Come accennato nella parte introduttiva, attualmente la maggior parte degli apparati tecnologici più avanzati si basa sull'utilizzo di materiali derivati dal silicio. L'abilità nel generare strutture 3D di dimensioni sempre più ridotte (fino alla scala del nanometro) sta ricoprendo perciò un ruolo chiave in ambito scientifico e tecnologico.

L'ottenimento di superfici di silicio con determinate funzionalità è legato quindi alla possibilità di derivatizzare tali superfici con le specie chimiche di interesse. La strategia più diffusa è quella che prevede l'idrosilizzazione di strati sottili di silicio H-terminale³.

Il maggiore ostacolo per lo sviluppo di tali materiali ibridi (organici e basati sul silicio) è da ricercare nelle difficoltà incontrate per la loro caratterizzazione. Non esiste infatti una vera e propria tecnica di riferimento, ma l'approccio è quello di utilizzare diversi metodi di indagine complementari fra loro. In questo lavoro il processo di CSA (coordination cage self-assembly) è stato caratterizzato mediante la combinazione di indagini XPS (spettroscopia fotoelettronica ai raggi X), AFM (microscopia di forza atomica) e misure di spettroscopia di fluorescenza.

Le gabbie di coordinazione così ottenute sono contenitori molecolari⁴ molto interessanti in quanto possono trovare impiego per quanto riguarda la stabilizzazione di intermedi di reazione⁵, la catalisi⁶, e grazie alla reversibilità che governa la loro formazione si può avere il controllo sull'inclusione e il rilascio di determinate specie⁷.

Nella figura 5.1 viene rappresentato schematicamente il processo di self assembly studiato, che avviene grazie all'effetto templante del Pt(II) sulla formazione del complesso fra il cavitando 1 e il composto 2.

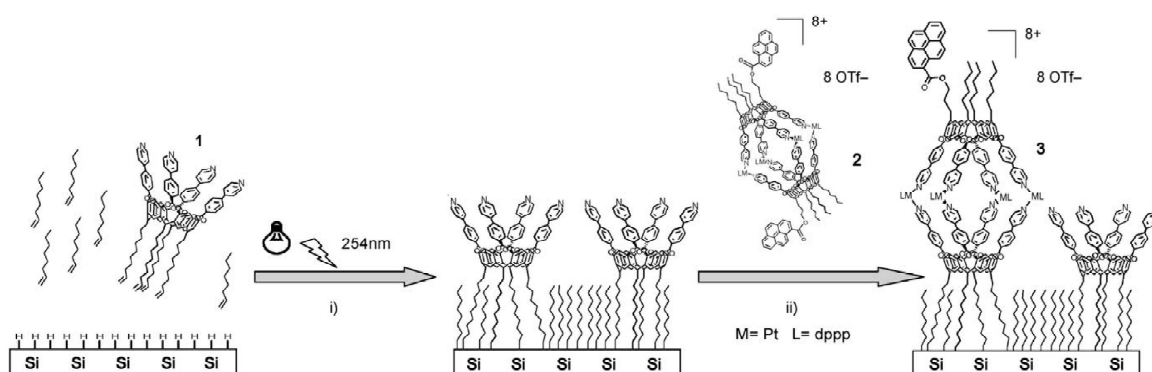


Figura 5.1. (i) Grafting di una superficie di Si(100) (H-terminale) con un opportuno mix di cavitando 1 e ottile, utilizzando la idrosilizzazione fotochimica. (ii) CSA (coordination cage self assembly) fra la superficie di silice derivatizzata con 1 e il complesso 2, che possiede un'unità pyrene terminale.

Le misure in AFM e XPS, combinate a prove di fluorescenza (grazie alla presenza del pyrene come probe fluorescente) ha permesso di poter concludere quanto segue.

Misure XPS: Le analisi XPS di un campione in cui la superficie di silice è stata derivatizzata da un mix di ottile e composto 1 hanno mostrato la presenza di tutti gli elementi aspettati. L'osservazione della banda 1s per l'azoto, principalmente centrata a 399,99 eV, è un'evidenza del fatto che il cavitando 1 sia legato covalentemente alla superficie. Il rapporto atomico N/C sperimentale è consistente con il rapporto N'/C' calcolato in base alla composizione molare della soluzione iniziale utilizzata per effettuare il grafting. Dopo il processo di CSA, le analisi XPS hanno mostrato la presenza di nuovi elementi, ovvero Pt, F ed S. La formazione della gabbia 3 è confermata dalla presenza di un segnale nella zona degli orbitali 4f del Pt. In particolare, la componente 7/2 del 4f, centrata a 73 eV è caratteristica per le specie Pt(II)⁸. Al fine di verificare che la presenza del segnale del Pt sia effettivamente associata alla formazione della gabbia 3, è stato sottoposto allo stesso trattamento una superficie di silice derivatizzata col solo ottile. In questo caso, non è stato rilevato alcun segnale nella regione del Pt. Oltretutto, i rapporti F/Pt e S/Pt sono rispettivamente 6 e 2, come aspettato per la gabbia 3 ottavalente

circondata da 8 controioni OTf⁻. Si può notare inoltre che il rapporto atomico N/Pt (28) è molto maggiore rispetto al valore (2) che ci si può aspettare nel caso di un processo di self-assembling fra una superficie con il 100% di cavitando 1 graftato, il che indica che il CSA sulla superficie avviene con un rendimento piuttosto basso (4%). Non è stata osservata alcuna dipendenza angolare del segnale del Pt, il che suggerisce che non vi siano effetti dovuti alla presenza di cavitando unità separate di cavitando 2.

Misure AFM: La caratterizzazione AFM è stata effettuata in modalità “high amplitude” per evitare possibili modificazioni della superficie derivatizzata per effetto di interazioni con la punta del microscopio. Prima di procedere con le misurazioni AFM, sono state condotte delle simulazioni al calcolatore per avere una stima delle dimensioni delle varie specie. I conformeri ad energia minore sono rappresentati in figura 5.2a,b.

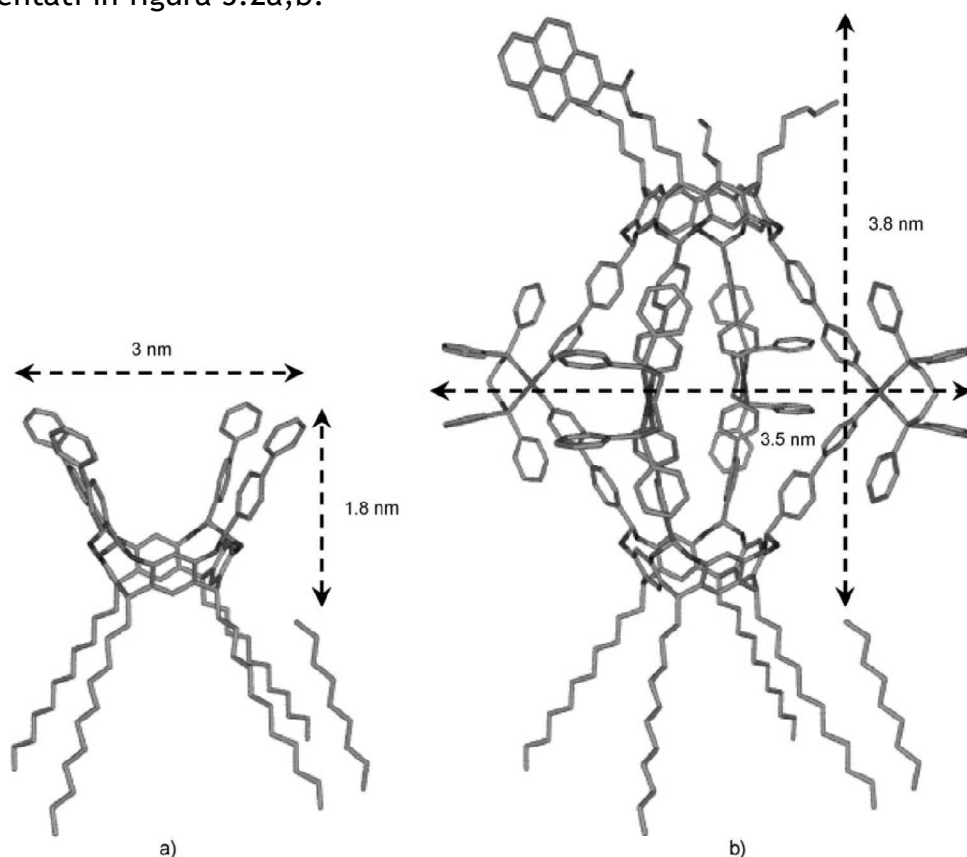


Figura 5.2. Modello molecolare e dimensioni del cavitando 1 (a) e della gabbia 3 (b) rispetto all’ottile.

Dopo un opportuna fase di preparazione e pulizia, sono state registrate le topografie (su aree di $4\mu\text{m}^2$) che, per tutti i campioni analizzati hanno fornito risultati in accordo con quanto aspettato nel rispetto della composizione della superficie.

Misure di fluorescenza: In figura 5.3 sono mostrati gli spettri di emissione in riflettanza delle diverse superfici di silice registrati utilizzando una sorgente molto potente, un laser He-Cd con emissione a 325 nm (dove il pyrene assorbe molto bene), irradiando solo una piccola zona del supporto solido in modo da indagare solo su una piccola parte dei fluorofori presenti. Per testare la riproducibilità delle misure sono stati registrati più spettri in diverse zone della superficie. Si può notare come gli spettri di fluorescenza di una superficie di silice derivatizzata col solo ottilo, sulla quale è stato deposto per evaporazione del solvente uno strato di omogabbia 2, mostrino la presenza sia della tipica banda strutturata del monomero del pyrene, sia quella dell'eccimero (5.3d), mentre se si effettua il processo di CSA sul medesimo supporto non si osserva alcun segnale di emissione (5.3b). La superficie in cui è stata creata la gabbia 3 tramite CSA, mostra invece (5.3c) la banda strutturata tipica del pyrene, anche se debolmente spostata verso lunghezze d'onda maggiori. Tale spostamento della fluorescenza rispetto a quanto ricavato da misure in soluzione (5.3a) è stato attribuito alla perturbazione elettronica a lungo raggio associata al campo elettrico esercitato dalla superficie di silicio e ricorda molto da vicino quanto è stato osservato per lo stesso cromoforo legato alla superficie di nanoparticelle di oro⁹. Infine, l'assenza della banda di emissione dell'eccimero sta ad indicare che le gabbie 3 non sono in stretto contatto fra loro ma sufficientemente lontane le une dalle altre, come osservato in AFM.

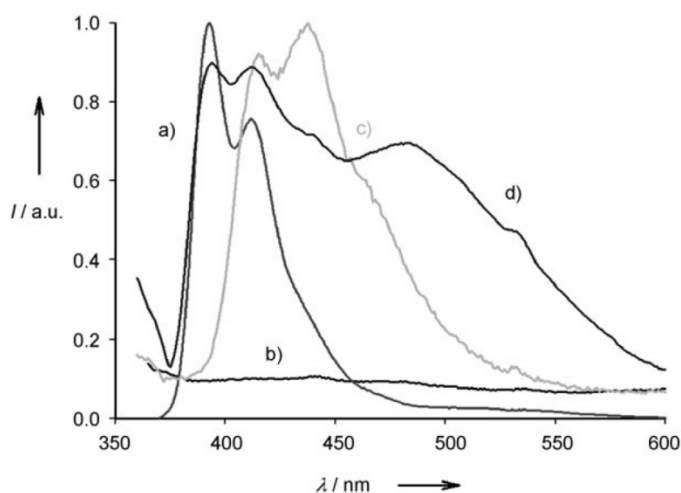


Figura 5.3. Spettri di emissione ($\lambda_{\text{ecc}} = 325 \text{ nm}$) di: a) soluzione areata in diclorometano della omogabbia 2. b) CSA di 2 su una superficie di silice derivatizzata con solo ottilo. c) gabbia 3 ottenuta per self-assembly di 2 su silice derivatizzata con 1 per CSA. d) strato sottile di 2 deposto per evaporazione del solvente.

5.3 La nuova sonda fluorescente: l'idea e la progettazione.

L'utilizzo del pyrene come marcatore fluorescente in grado di evidenziare l'effettiva formazione del complesso ha indotto ad utilizzare ancora questo approccio per la progettazione, la sintesi e l'utilizzo di nuove specie per costituire un sistema con funzionalità simili.

Sono quindi state sintetizzate le molecole di figura 5.4, in cui sono presenti due cavitandi (C_1 e C_2 , recettori), un guest fluorescente (composto **1**), un fluorescente ed un guest di riferimento (composti **2** e **3**), un guest alternativo (competitore: composto **4**).

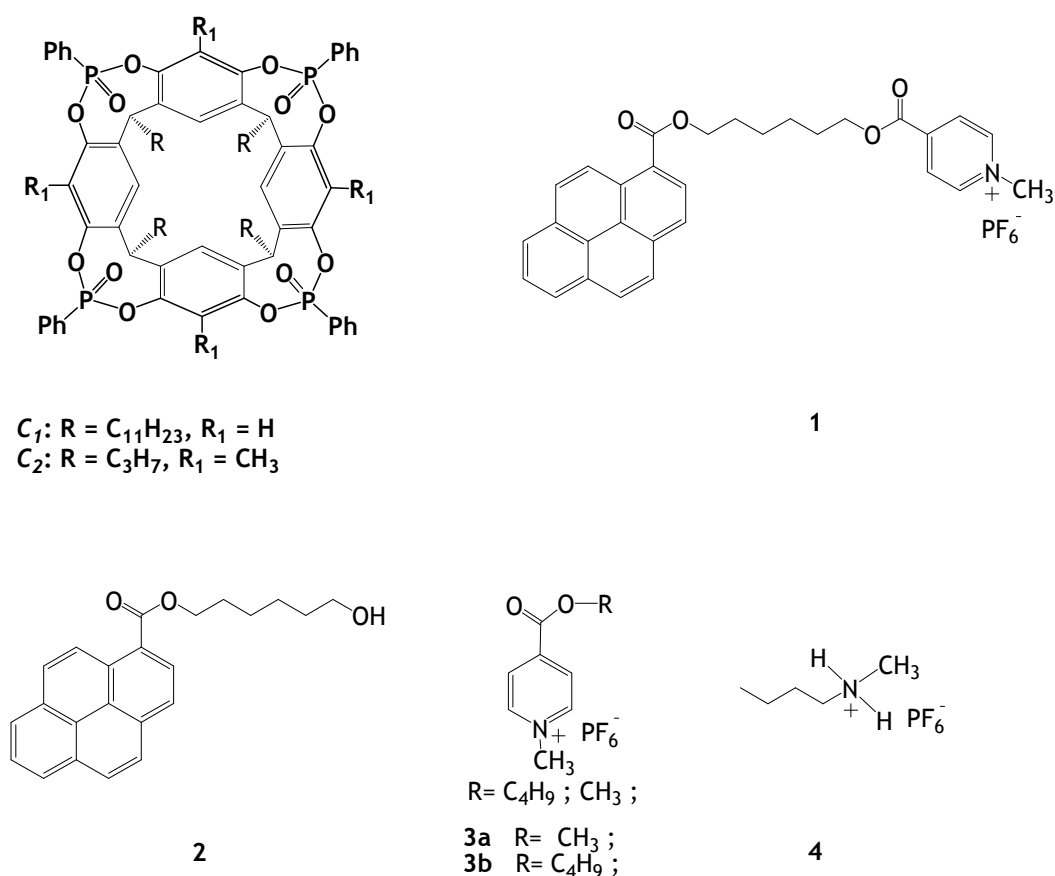


Figura 5.4. Le molecole sintetizzate. C_1 e C_2 : cavitandi con diversa terminazione, **1**: Pyrene legato ad un metil piridinio per mezzo di una catena alifatica contenente funzioni esteree, **2** e **3**: composti di riferimento, **4**: guest competitore.

E' stato perciò condotto uno studio preliminare sulla complessazione reversibile di **3** e **4** con il cavitando **C₁** e sono state ricavate, per le due interazioni, delle costanti di associazione in pieno accordo con quanto aspettato.

L'interazione, in questi sistemi, è dovuta principalmente all'effetto sinergico di tre differenti forze:

- Interazione di natura catione-dipolo, $N^+ \cdots O=P$.
- Interazione $CH_3-\pi$ fra l'interno della cavità, ricco di elettroni π , e il CH_3 acido legato all'azoto.
- Formazione simultanea di due legami H fra i due gruppi $P=O$ adiacenti del cavitando e i due idrogeni legati all'azoto (solo per il composto **4**)

Per il complesso **C₁·3b** è stata determinata, attraverso titolazioni ITC in diclorometano, una costante di associazione $K_{ass} = 7.8 \times 10^6$, mentre per il complesso **C₁·4** il valore della K_{ass} eccede il limite massimo di quantificazione per questa tecnica ($10^2 < K_{ass} < 10^7$)¹⁰.

Alla luce di questi dati si è pensato che potesse essere interessante utilizzare come guest per la cavità **C₁** il composto **1**, che possiede un metilpiridinio come unità di riconoscimento (come il composto **3**) e un pyrene come probe fluorescente, collegati fra loro per mezzo di una catena contenente due funzioni esteree. Il pyrene è stato scelto come unità fluorescente per diverse ragioni, in particolare perchè possiede una buona resa quantica, la possibilità di dare eccimeri e quindi di segnalare per mezzo dell'emissione tipica di queste specie la vicinanza fra le unità pireniche, la possibilità di fornire segnale di fluorescenza anche vicino a superfici di silicio e la capacità di dar luogo a fenomeni di electron transfer con le unità piridinio.

5.4 Risultati ottenuti e discussione.

Nello spettro di assorbimento di **1**, il contributo del pyrene è dominante rispetto a quello del piridinio, localizzato attorno ai 300 nm (figura 5.5).

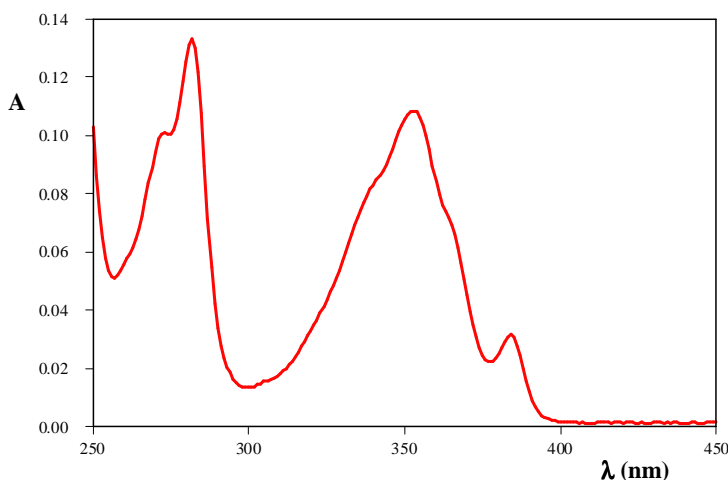


Figura 5.5 Spettro di assorbimento di **1**, in cui è evidente il maggior contributo del pyrene rispetto al piridinio.

Dal punto di vista dell' emissione invece, la presenza del piridinio influisce sul valore del rendimento quantico calcolato rispetto al composto di riferimento **2**, abbassandolo di trenta volte. Anche per quanto riguarda i tempi di vita si osservano variazioni analoghe: il tempo di vita di **1** risulta più corto per la presenza di una via di disattivazione più veloce rispetto all'emissione (5.8 ns contro 0.2 ns).

Il meccanismo proposto per questo tipo di spegnimento è quello del trasferimento di elettrone fra il pyrene eccitato e il piridinio. A conferma di questo sono state effettuate prove di elettrochimica, in cui è stato osservato che l'energia del singoletto eccitato del pyrene ($E^{00} = 3.17$ eV) è sufficiente per far sì che avvenga il trasferimento di un elettrone dal pyrene ($E^0_{(2+/2)} = +1.53$ V, processo irreversibile) all'unità piridinio ($E^0_{(3a/3a-)} = -0.68$ V, processo irreversibile). L'aggiunta di **C**₁ ad una soluzione in diclorometano di **1** non comporta variazioni dal punto di vista dello spettro di assorbimento nella zona 320-345 nm, mentre a più basse lunghezze d'onda, dove il cavitando assorbe, si ha un semplice contributo di somma fra gli

spettri di assorbimento delle due specie. Per quanto riguarda invece l'emissione, l'aggiunta di quantità via via crescenti di C_1 comporta evidenti cambiamenti nello spettro di emissione, e si nota un incremento del valore di intensità di circa 6 volte. (Figura 5.6a), accompagnato da un proporzionale incremento del tempo di vita fino a 1.2 ns.

In figura 5.6 vengono quindi mostrati gli spettri di fluorescenza per due titolazioni effettuate: in 5.6a si è partiti da una concentrazione di **1** pari a 1×10^{-5} M e si è aggiunto C_1 da 0 a 1,2 equivalenti. In 5.6b invece si è partiti da concentrazioni equimolari di C_1 e **1** (1×10^{-5} M) e sono state effettuate aggiunte di **4** da 0 a 1,3 equivalenti.

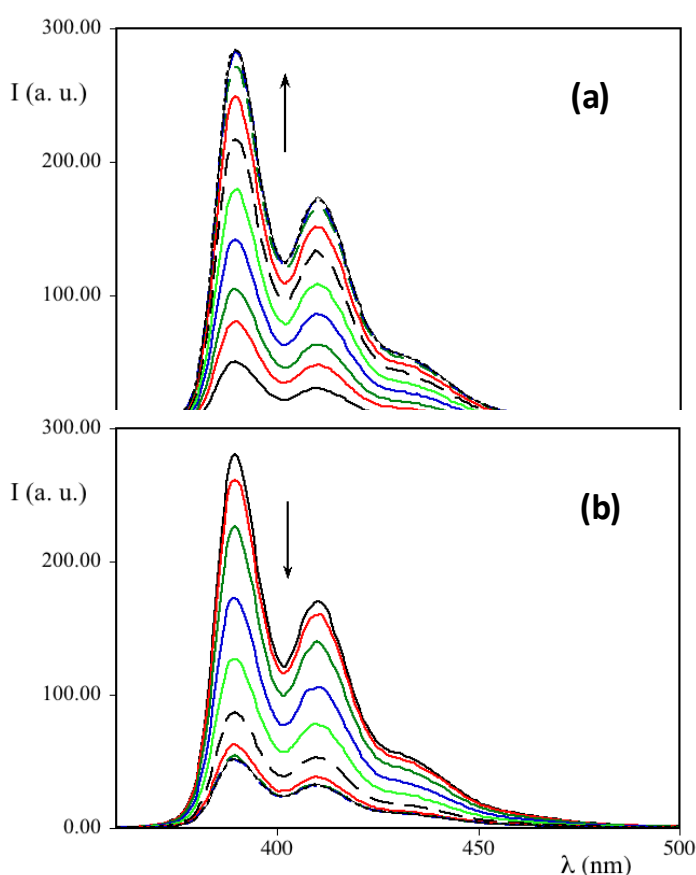


Figura 5.6 (a) Titolazione di una soluzione di **1** (10^{-5} M) con quantità crescenti di C_1 . (b) Titolazione di una soluzione di C_1 e **1** equimolari (10^{-5} M) con il composto **4**

Sono state condotte anche titolazioni analoghe fra il composto **2** e il cavitando C_1 , in cui non sono stati registrati cambiamenti, né per quanto riguarda

l'assorbimento, né per quanto riguarda l'emissione. Questa totale assenza di variazioni induce a pensare che non vi siano interazioni dirette fra il pyrene e la cavità, anche dopo la formazione del complesso, nel caso della titolazione fra C_1 e **1**. L'aumento di emissione che si osserva in figura 5.6a è stato perciò attribuito alla diminuzione di esoergonicità del processo di trasferimento di elettrone fra pyrene e piridinio, che come conseguenza porta ad un calo della costante cinetica per questo fenomeno.

L'inclusione del metilpiridinio (elettron povero) all'interno della cavità molto ricca di elettroni, ha quindi come effetto quello di rendere il processo di riduzione più endoergonico, cioè richiede un quantitativo di energia maggiore per avvenire. Benchè sia molto complesso fare analisi quantitative basate su processi irreversibili, si può portare come evidenza sperimentale di questa affermazione lo shift di circa 40 mV verso valori negativi del potenziale di riduzione del metilpiridinio di **1** conseguentemente all'aggiunta di 2 equivalenti di C_1 . Dai dati della titolazione spettro fluorimetrica è stato possibile calcolare la costante di associazione fra il composto **1** e il cavitando C_1 : il valore ricavato risulta in accordo con quanto ricavato dalle titolazioni ITC ($K_{ass} = 8 \times 10^{-6} M^{-1}$).

Per dimostrare la reversibilità del processo, sono state aggiunte quantità via via crescenti di composto **4** ad una soluzione contenente quantità equimolari di C_1 ed **1**. Come già accennato precedentemente, la costante di associazione per la formazione del complesso $C_1 \cdot 4$ risulta maggiore di quella $C_1 \cdot 3$, e quindi quello che ci si aspetta è che il guest **4** riesca ad interagire con la cavità C_1 , in modo da liberare **1** in soluzione. Come si può vedere dalle figure 5.6b e 5.7, l'aggiunta di **4** ha come effetto una graduale diminuzione di emissione del pyrene, fino al raggiungimento del valore tipico del composto **1** libero in soluzione, e questo dimostra chiaramente che il sistema è reversibile. Il passo successivo è stato quello di provocare la dissociazione di $C_1 \cdot 4$ per mezzo dell'aggiunta di una base in grado di deprotonare l'ammonio binario di **4**. Allo scopo è stato utilizzato il DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene), e quello che si è notato è stato un crescente recupero di fluorescenza da parte del pyrene, segno che si stava ristabilendo

l'interazione fra C_1 ed **1**. A questo punto, l'aggiunta di un equivalente di acido triflico ha avuto ancora una volta l'effetto di riportare il sistema nello stato in cui **4** (riprotonato dall'acido triflico) si trova all'interno della cavità (composto **1** spento). Nella figura 5.7 è mostrato il ciclo completo di titolazioni qui descritte.

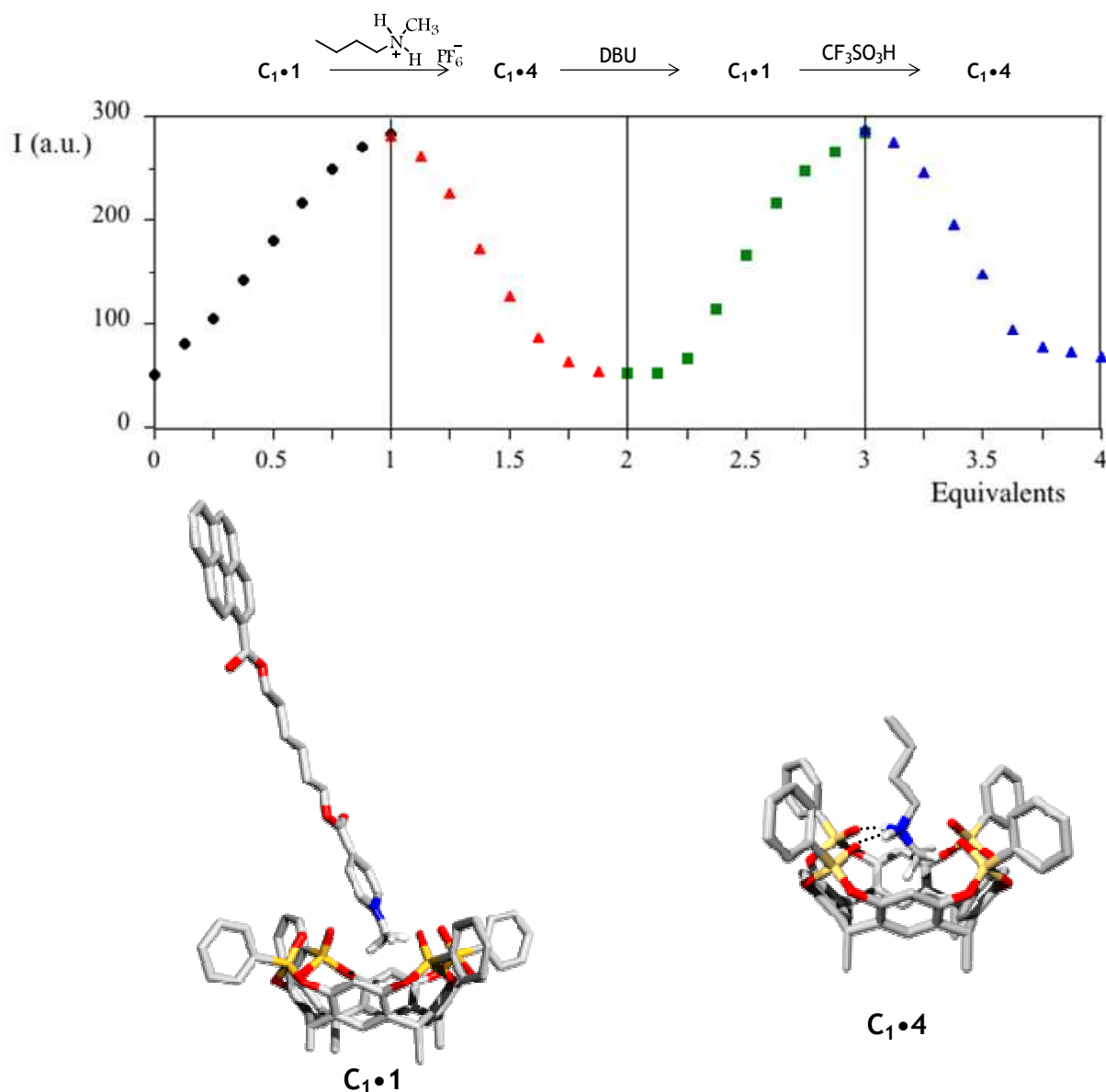


Figura 5.7 Fluorescenza di una soluzione di **1** ($[1] = 1 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{ecc} = 345$ nm, $\lambda_{em} = 390$ nm) in conseguenza dell'aggiunta del guest competitore **4** (1 equivalente), della base DBU (1 equivalente) e dell'acido triflico (1 equivalente). In basso sono rappresentati i modelli molecolari dei complessi fra il cavitando e di due guest.

E' importante sottolineare che la formazione del complesso $C_1 \cdot 1$ è accompagnata da un consistente aumento del segnale di luminescenza, caratteristica questa che soddisfa in pieno i requisiti richiesti ad un sistema per rappresentare un sensore (il valore finale del rendimento quantico risulta infatti di $\Phi = 0.08$). Questo risultato non è da sottovalutare, in quanto in letteratura sono presenti lavori in cui è riportato solamente l'effetto di spegnimento esercitato dalla cavità resorcinarenica nei confronti del pyrene¹¹. Oltretutto, mentre i processi PET sono utilizzati spesso con successo per modulare l'emissione di un fluoroforo grazie alla presenza del doppietto elettronico disponibile di un azoto¹², in questo caso si è in presenza di una trasduzione del segnale piuttosto elegante, perché rende il processo indipendente dalla presenza di protoni e cationi metallici. Oltretutto è bene sottolineare che un design differente del sistema non avrebbe prodotto risultati simili.

Per esempio, una ipotetica molecola lineare con un pyrene ed un gruppo amminico covalentemente legati potrebbe, dal punto di vista della luminescenza, essere caratterizzata dall'emissione spenta del pyrene qualora i due gruppi si trovassero sufficientemente vicini fra loro. La protonazione dell'ammina comporterebbe da un lato l'occupazione del doppietto responsabile dello spegnimento, e dall'altro l'inserimento nella cavità, se presente. In queste condizioni, si può facilmente concludere che l'aumento del segnale di fluorescenza sarebbe stato osservato a prescindere dalla presenza della cavità e, di conseguenza, del processo di associazione.

5.5 Bibliografia

1. J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. Nuzzo, G. M. Withesides, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103 -1169.
2. M. Busi, M. Laurenti, G. G. Condorelli, A. Motta, M. Favazza, I. L. Fragalà, M. Montalti, L. Prodi and E. Dalcanale, *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 6891.
3. M. R. Linford, P. Fenter, P. M. Eisenberg, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3145 -3155; b) A. B. Sieval, A. L. Demirel, J. M. Nissink, J. H. van der Maas, W. H. De Jeu, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhçlter, *Langmuir* **1998**, 14, 1759 -1768; c) Q.-Y. Sun, L. C. P. M. d Smet, B. van Lagen, M. Giesberg, P. C. Thune, J. Van Engelenburg, F. A. d Wolf, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhçlter, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2514 -2523.
4. D. J. Cram, J. M. Cram, *Container Molecules and Their Guests* (Ed.: J. F. Stoddart), Royal Society of Chemistry, **1994**.
5. a) M. Yoshizawa, Y. Takeyama, T. Okano, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6311 - 6312; b) M. Yoshizawa, K. Kumazawa, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13456 -13457.
6. a) H. Ito, T. Kusukawa, M. Fujita, *Chem. Lett.* **2000**, 29, 598 -599; b) M. Yoshizawa, M. Tamura, M. Fujita, *Science* **2006**, 312, 251 -254; c) D.H. Leung, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9781 - 9797.
7. a) P. Jacopozzi, E. Dalcanale, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 665 -667; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 613 - 615; b) O. D. Fox, N. K. Dalley, R. G. Harrison, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7111 -7112.
8. a) G. M. Bancroft, T. Chan, R. J. Puddenphatt, M. P. Brown, *Inorg. Chim. Acta* **1981**, 53, L119 L120; b) W. M. Riggs, *Anal. Chem.* **1972**, 44, 830 - 832; c) P. Brant, J. H. Enemark, A. L. Balch, *J. Organomet. Chem.* **1976**, 114, 99-106.

9. a) M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Battistini, *Langmuir* **2004**, 20, 7884 -7886; b) P. Anger, P. Bharadway and L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, 96, 113 002.
10. J. L. Sessler, D. E. Gross, W.-S. Cho, V. M. Lynch, F. P. Schmidtchen, G. W. Bates, M. E. Light and P. A. Gale, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 12281.
11. M. Inhouye, K. Hashimoto and K. Isagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 5517.
12. L. Prodi, F. Bolletta, M. Montalti and N. Zaccheroni, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 59.

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI E PUBBLICAZIONI

Con questo lavoro di tesi si è cercato da un lato di dare un contributo al settore dei sensori chimici, caratterizzando e sviluppando diversi sistemi che presentano promettenti proprietà per l'utilizzo nella realizzazione di sensori luminescenti, e dall'altro di studiare sistemi di nanoparticelle di oro per identificarne e caratterizzarne i processi che portano all'interazione con un'unità fluorescente di riferimento, il pirene.

Quest'ultima parte della tesi, sviluppata nel capitolo 4, sebbene possa apparire "slegata" dall'ambito della sensoristica, in realtà non lo è in quanto il lavoro di ricerca svolto rappresenta una buona base di partenza per lo sviluppo di sistemi di nanoparticelle metalliche con un possibile impiego in campo biomedico e diagnostico.

Tutte le specie studiate, seppur molto diverse tra loro, posseggono quindi buone caratteristiche di luminescenza ed interessanti capacità di riconoscimento, più o meno selettivo, di specie in soluzione o allo stato gassoso.

L'approccio generale che è stato adottato comporta una iniziale caratterizzazione in soluzione ed una susseguente ottimizzazione del sistema mirata a passare al fissaggio su supporti solidi in vista di possibili applicazioni pratiche.

A tal proposito, nel capitolo 3 è stato possibile ottenere un monostrato organico costituito da un recettore (un cavitando), dotato di una parte fluorescente le cui proprietà di luminescenza sono sensibili alla presenza di una funzione chimica che caratterizza una classe di analiti, gli alcoli. E' interessante sottolineare come lo stesso sistema in soluzione si comporti in maniera sostanzialmente differente, mostrando una capacità di segnalare l'analita molto meno efficiente, anche in funzione di una diversa orientazione della parte fluorescente. All'interfaccia solido-gas invece, l'orientamento del fluoroforo gioca un ruolo chiave nel processo

di riconoscimento, e ottimizzando ulteriormente il setup sperimentale e la composizione dello strato, sarà possibile arrivare a segnalare quantità di analita sempre più basse.

Nel capitolo 5 invece, è stato preso in esame un sistema le cui potenzialità, per un utilizzo come sonda fluorescente nel campo delle superfici di silicio, sembra promettere molto bene. A tal proposito sono stati discussi anche i risultati del lavoro che ha fornito l'idea per la concezione di questo sistema che, a breve, verrà implementato a sua volta su superficie solida.

In conclusione, le ricerche descritte in questa tesi hanno quindi contribuito allo sviluppo di nuovi chemosensori, cercando di migliorare sia le proprietà fotofisiche dell'unità attiva, sia quelle dell'unità recettrice, sia, infine, l'efficienza del processo di traduzione del segnale. I risultati ottenuti hanno inoltre permesso di realizzare alcuni prototipi di dispositivi sensoriali aventi caratteristiche molto promettenti e di ottenere informazioni utili per la progettazione di nuovi dispositivi (ora in fase di sviluppo nei laboratori di ricerca) sempre più efficienti, rispondendo in tal modo alle aspettative con cui questo lavoro di dottorato era stato intrapreso.

Il lavoro di dottorato presentato in questa tesi ha portato alle seguenti pubblicazioni:

1. M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Battistini, "Modulation of the photophysical properties of gold nanoparticles by accurate control of the surface coverage", *Langmuir*, **20**, 7884-7886 (2004).
2. M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, G. Battistini, S. Marcuz, F. Mancin, E. Rampazzo, U. Tonellato, "Size effect on the fluorescence properties of dye doped silica nanoparticles", *Langmuir*, **22**, 5877-5881 (2006).
3. M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, M. Beltrame, T. Morotti, and S. Quici, "Stabilization of Gold Nanoparticles by Metal Ions Complexation", *New J. Chem.*, **31**, 102-108 (2007).
4. S. Nardis, F. Mandoj, F. R. Fronczek, L. Prodi, M. Montalti, G. Battistini, K. M. Smith, R. Paolesse, "Synthesis and Functionalization of Germanium Triphenylcorrolate: The First Example of a Partially Brominated Corrole", *Eur. J. In. Chem.*, **16**, 2345-2352 (2007).
5. L. Prodi, G. Battistini, L. S. Dolci, M. Montalti, N. Zaccheroni "Luminescence of Gold Nanoparticles" in *Frontiers in Surface Nanophotonics: Principles and Applications*, D. L. Andrews and Z. Gaburro ed., Springer series in Optical Sciences, Springer, New York, 2007, pag. 99.
6. G. Battistini, P. G. Cozzi, J.-P. Jalkanen, M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, F. Zerbetto, "The erratic emission of pyrene on Gold nanoparticles", *ACS Nano*, **1**, 77-84 (2008)
7. G. Battistini, P. G. Cozzi, M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, "Propargylic Esters and Metallotropic Schiff on Gold Surface: An Access to Gold Nanoparticles Capped with Fluorescent Terminal Alkynes", *J. Am. Chem. Soc.*, submitted.
8. E. Biavardi,^a G. Battistini,^b M. Montalti,^b R. M. Yebeutchou,^a L. Prodi^{*b}, E. Dalcanale^{*a} "Fully reversible guest exchange in tetrakisphosphonate cavitand complexes probed by fluorescence spectroscopy", *Chem. Comm.*, in press